



Ciências
ULisboa

**Desenvolvimento de metodologias e dispositivos analíticos
com deteção ótica para a indústria agroalimentar**

Doutoramento em Química
Química Física

Diogo Ramadas da Silva Costa e Sousa

Tese orientada por:
Doutora Ana Pimenta da Gama Silveira Viana
Doutor António Carlos Henriques Cascalheira

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor



Ciências
ULisboa

**Desenvolvimento de metodologias e dispositivos analíticos
com deteção ótica para a indústria agroalimentar**

Doutoramento em Química
Química Física

Diogo Ramadas da Silva Costa e Sousa

Tese orientada por:
Doutora Ana Pimenta da Gama Silveira Viana
Doutor António Carlos Henriques Cascalheira

Júri:

Presidente:

- Doutora Ana Maria Jara Ponces da Costa Freire

Vogais:

- Doutora Maria de Fátima Malveiro Bento
- Doutora Maria Cristina Fialho Oliveira
- Doutor António Carlos Henriques Cascalheira
- Doutor João Pedro Estrela Rodrigues Conde
- Doutor Jorge Manuel Palma Correia

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

Bolsa doutoramento empresa (ref: SFRH/BDE/33797/2009) co-financiada por FCT e Lumisense,Lda

Agradecimentos

Quero agradecer especialmente aos meus orientadores Doutor António Cascalheira e Doutora Ana Viana por toda a ajuda, apoio, disponibilidade e paciência demonstrado ao longo do projeto de doutoramento.

Ao Doutor António Cascalheira queria deixar um agradecimento especial pelos 8 anos de trabalho juntos e por estes 5 anos em que foi um pilar fundamental para eu conseguir levar este projeto a bom porto, sempre com a motivação necessária e aplicada em alturas chave. O meu muito obrigado.

Gostaria de agradecer à empresa, Lumisense por ter posto à minha disposição todos os meios necessários para a realização deste projeto, dando-me a oportunidade de integrar projetos nacionais e europeus que em muito contribuíram para a minha formação pessoal e profissional. Muito obrigado Eng.º Nuno Melo e Doutor Miguel Freitas.

Gostaria de agradecer a alguns grupos com quem privei ao longo deste projeto.

Ao grupo do INESC-MN pela excelente colaboração ao longo do projeto Demotox e em particular à Doutora Virgínia Chu, Doutor João Pedro Conde e ao Ruben Soares.

Ao grupo de eletroquímica interfacial do DQB coordenado pelo Doutor Jorge Correia.

Ao Doutor Rogério Tenreiro e Doutora Ana Tenreiro (grupo de Microbiologia e Biotecnologia do BioISI) pelo livre acesso aos seus laboratórios permitindo usufruir de aparelhos e reagentes não existentes na Lumisense,Lda.

À fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo apoio co-financeiro concedido através da bolsa de doutoramento em empresa (BDE) com a referência SFRH/BDE/33797/2009.

Um grande bem-haja aos meus pais que tudo fizeram para me proporcionarem chegar onde cheguei, às minhas irmãs por todo o apoio e motivação, e aos meus amigos por serem quem são.

Por fim, last but not least, um agradecimento especial para a Fabiana por toda a compreensão, carinho e apoio incondicional dado ao longo deste projeto, especialmente na parte final deste, em que o bom humor não imperou e o modo “rezingas” esteve constantemente em ON.

Resumo

A indústria agroalimentar encontra-se em grande expansão e a sua monitorização é uma inevitabilidade mais que evidente. Com imposições ditadas por regulamentações ou pelo mercado, existe uma necessidade constante na implementação de sistemas de qualidade fiáveis, com tempos de resposta adequados e se possível de baixo custo. Esta necessidade, é o motor para o aparecimento de novas técnicas e equipamentos miniaturizados com vista à quantificação e deteção de compostos químicos e biológicos de interesse neste mercado.

Neste contexto esta dissertação de doutoramento inserido no meio empresarial visou o estudo e desenvolvimento de sensores analíticos miniaturizados, para monitorização de diferentes parâmetros na indústria agroalimentar. O trabalho desenvolvido pode ser resumido em três grandes temas: contribuição para o desenvolvimento de uma plataforma para a construção de biossensores óticos; otimização de um equipamento e respetivo imunoensaio miniaturizado para a deteção de Ocratoxina A e desenvolvimento de sistemas analíticos para a quantificação de pH e azoto assimilável em vinho.

Perspetivando a construção de uma plataforma de biossensores óticos, com todos os reagentes imobilizados, efetuou-se o estudo da modificação de superfícies (ITO e Au) recorrendo a polieletrólitos funcionalizados com ferroceno para a mediação da reação de eletroquimioluminescência do sistema luminol/H₂O₂. A mediação por diferentes derivados de ferroceno foi demonstrada em solução, e otimizada tendo em conta determinados fatores tais como pH, força iónica, concentração de reagentes (razão luminol/ferroceno) e método de perturbação eletroquímica no processo de eletroquimioluminescência.

Sintetizou-se um polieletrólito catiónico funcionalizado com o grupo funcional ferroceno, tendo a sua adsorção electrostática sido avaliada em ITO e ouro previamente modificado com uma monocamada de 3-mercaptopropanosulfonato. A modificação dos elétrodos com recurso ao processo de montagem de camada por camada foi estudada, bem como a sua estabilidade a diferentes pH. Os elétrodos modificados aparentam uma elevada estabilidade eletroquímica quando avaliados em meios acídicos em oposição ao observado quando perturbados em soluções básicas, ideais para a intensificação do sinal ótico.

No âmbito da participação no projeto europeu “Demotox” desenvolveu-se um protótipo pré-industrial para a deteção de Ocratoxina A (OTA) em cereais e vinho, recorrendo a um ensaio imunoenzimático em suporte sólido, baseado no princípio da interação específica entre anticorpo e antigénio (OTA). A miniaturização e alteração do formato do imunoensaio de competitivo indireto para competitivo direto bem como a otimização efetuada permitiu diminuir o tempo de ensaio, o número de passos no processo de deteção bem como revelar-se eficiente para a deteção de OTA em vinho no limite legal (2 ng/mL).

A validação do equipamento, como sistema analítico semi-quantitativo de resposta binária (sim/não; contaminado/não-contaminado) foi realizado de acordo com as normas europeias em vigor, para cereais de alimentação animal, apresentando

resultados bastante satisfatórios e passíveis de serem utilizados para o limite legal estabelecido 250 ppb de OTA.

No terceiro tema abordado procedeu-se à construção de um eletrodo de pH de estado sólido e ao desenvolvimento de técnicas para a quantificação de azoto assimilável no vinho.

A construção de um eletrodo de pH de estado sólido baseou-se na deposição eletroquímica de óxidos de irídio. A otimização do método de crescimento eletroquímico (potenciodinâmico e galvanoestático) foi efetuado contemplando o tempo de resposta e respetiva estabilidade dos depósitos obtidos, em soluções de diferentes pH. A resposta otimizada revelou um comportamento *super-Nernstian* e boa linearidade com o pH em soluções tampão. O sinal obtido em amostras reais, vinho, apresenta uma elevada interferência de compostos redox presentes. Tal interferência foi minimizada pela deposição adicional de membranas de polifenol ou nafion, sem ser no entanto totalmente colmatada, estando em aberto a sua otimização.

Para a determinação de iões amónio construiu-se um eletrodo seletivo de iões amónio (ISE) tendo sido avaliados vários parâmetros na sua construção, tais como: número de camadas da membrana seletiva, a presença e natureza de um condutor misto iónico/eletrónico. O eletrodo demonstrou excelente desempenho em solução tampão em oposição com o observado em amostras reais, devido à presença de uma elevada concentração de iões potássio no vinho.

Com base nas propriedades de fluorescência de emissão de isoindolos provenientes da reação de *o*-ftaldeído, um nucleófilo e NH_4^+ ou α -aminoácidos, e utilizando como base a plataforma de medida Enosense® criada pela Lumisense,Lda desenvolveram-se dois métodos de medida, um para a determinação de iões amónio e outro para a determinação de aminoácidos em amostras de vinho.

Palavras chave: Polieletrólito; Electroquimioluminescência; Microfluídica; Sistemas miniaturizados; Sensores.

Abstract

The agrifood industry is in expansion and its monitoring is an inevitability more than evident. With impositions dictated simultaneously by legal regulations and market, there is a constant need for the implementation of reliable control quality systems, with adequate response times and whenever possible with low cost. This need, is the drive for the development of new miniaturized analytical techniques and equipments aimed for the quantification and detection of chemical and biological compounds of interest in this market.

In this context this doctoral dissertation aimed at the study and development of miniaturized analytical sensors for monitoring different parameters in the agribusiness industry. The work can be subdivided into three main themes: contribution to the development of a platform for the construction of optical biosensors, optimization of an equipment and corresponding miniaturized immunoassay for the detection of Ochratoxin A and development of analytical systems for the measurement of pH and yeast assimilable nitrogen in wine.

Aiming at the construction of a platform for optical biosensors, with all the reagents immobilized on an electrode, a study was conducted on surface modification (IndiumTin Oxide (ITO) and Au) by ferrocene functionalized polyelectrolytes for the mediation of the electrochemiluminescence reaction between luminol and H_2O_2 . The mediation of distinct ferrocenes derivatives was demonstrated in solution, and the experimental conditions were optimized considering the pH, ionic strength, concentration of reagents (molar fraction luminol/ferrocene) and the applied electrochemical method in the ECL process.

The electrostatic adsorption of the synthesized ferrocene functionalized cationic polyelectrolyte was evaluated in ITO and gold surfaces, where the latter was previously modified with a self-assembled monolayer of (3-mercaptopropyl)sulfonate monolayer.

The modification of the electrode surfaces with thin films, formed via the adsorption of a layer-by-layer assembly of charged polyelectrolytes, revealed a high electrochemical stability in acidic media as opposed to the observed when studied in basic solutions, which are ideal for the intensification of the optical signal.

In the context of Lumisense participation in a European project "Demotox", a pre-industrial prototype was developed for the detection of Ochratoxin A (OTA) in cereals and wine, by means of an enzyme-linked immunosorbent assay in solid support, based on the principle of specific interaction between antibody and antigen (OTA). The miniaturization and the format change of the immunoassay from an indirect competitive to a direct competitive immunoassay, as well as its performance optimization, allowed to decrease the total assay time, the number of involved steps, and also enabled OTA detection in wine at the legal limit (2 ng/mL).

The equipment validation, as an analytical semi-quantitative system based on a binary response (yes/no; contaminated/non-contaminated) was performed in accordance to European standards for cereals used for animal feed, presenting very satisfactory results and allow it to be used for the legal limit established for OTA of 250 ppb.

The third theme concerned the construction of a solid state pH probe, as well as the development of optical methods for the quantification of yeast assimilable nitrogen in wine. The pH probe was constructed based on the electrochemical deposition of iridium oxides. The optimization of the electrochemical growth methods (potentiodynamic and galvanostatic) was performed by considering the stability and response time of the obtained deposits, at solutions with different pH. The optimized answer showed super-Nernstian response with good linearity in buffer solutions. The signal obtained in real wine samples reveals a high interference of the redox compounds present in wine matrix. Such interference was slightly minimized by adding a membrane of polyphenol or nafion, without being totally surpassed, opening space for further optimization.

An ion solid state selective electrode probe was developed for the determination of ammonium ions in wine. A number of parameters have been optimized during the electrode construction, such as number of layers of the selective membrane, the presence and nature of a ionic/electronic conductive layer. The probe demonstrated excellent performance in buffer solution in opposition with the observed in real samples, due to the presence of a high concentration of potassium ions in the wine.

Based on the fluorescence properties of the isoindole products, formed during the reaction of o-phthalaldehyde, a nucleophile and NH_4^+ or α -amino acids, and using Enosense® platform, developed by Lumisense Lda for optical detection, two analytical methodologies were successfully developed, one for the determination of ammonia ions and another for the determination of amino acids in wine samples.

Keywords: Polyelectrolyte; Electrochemiluminescence; Microfluidic; Miniaturized systems; Sensors.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO GERAL E ESTRUTURA DA TESE.....	1
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.1.1. <i>Biossensores</i>	4
1.1.2. <i>Imunoensaios</i>	6
1.1.3. <i>Sistemas analíticos miniaturizados</i>	8
1.2. OBJETIVO E ESTRUTURA DA TESE.....	10
1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
2. PREPARAÇÃO DE ELÉTODOS MODIFICADOS COM POLIELETRÓLITOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES ÓTICOS COM BASE EM ELETROQUIMIOLUMINESCÊNCIA	17
2.1. RESUMO.....	19
2.2. INTRODUÇÃO.....	21
2.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
2.3.1. <i>Reagentes</i>	27
2.3.2. <i>Equipamentos</i>	27
2.3.3. <i>Células eletroquímicas</i>	28
2.3.4. <i>Elétrodos de Trabalho</i>	29
2.3.5. <i>Síntese do polieletrólito funcionalizado com grupos ferroceno</i>	31
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
2.4.1. <i>Estudos em solução da eletroquimioluminescência de luminol na presença de derivados de ferroceno</i>	32
2.4.1.1. Influência do material de eletrodo (ITO e ouro).....	33
2.4.1.2. Influência do pH e do mediador.....	35
2.4.1.3. Influência da força iônica.....	38
2.4.1.4. Influência da razão entre luminol e derivado de ferroceno.....	39
2.4.1.5. Processo de EQL por aplicação de pulsos de potencial.....	40
2.4.1.6. Processo de EQL em fluxo.....	43
2.4.2. <i>Caraterização e aplicação de polieletrólitos catiónicos funcionalizados com ferroceno na modificação de eletrodos</i>	45
2.4.2.1. Caraterização do polieletrólito catiónico funcionalizado com ferroceno (Fc-PAH).....	46
2.4.2.2. Elétrodos de ITO modificados com Fc-PAH.....	49
2.4.2.3. Influência do pH na estabilidade do eletrodo de ITO modificado com Fc-PAH.....	51
2.4.2.4. Influência do tipo de eletrólito na estabilidade do eletrodo de ITO modificado com Fc-PAH ..	53
2.4.2.5. Estudo da estabilidade de um sistema de multicamadas de polieletrólitos em ITO.....	55
2.4.2.6. Eletrodo de Au modificado com monocamadas de alcanotóis.....	59
2.4.2.7. Estudo da formação de multicamadas de polietrólitos na superfície Au-MPS.....	65
2.4.2.8. Estudo da oxidação do luminol no eletrodo modificado, Au-MPS.....	67
2.5. CONCLUSÕES.....	71
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
3. DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO EQUIPAMENTO PARA A DETECÇÃO RÁPIDA E SIMPLES DE OCRATOXINA A EM CEREAIS, CERVEJA E VINHO	79

3.1.	RESUMO	81
3.2.	INTRODUÇÃO	83
3.3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	90
3.3.1.	<i>Equipamentos utilizados no desenvolvimento do projeto</i>	90
3.3.2.	<i>Reagentes</i>	91
3.3.3.	<i>Preparação de soluções e procedimentos</i>	92
3.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
3.4.1.	<i>Do protótipo laboratorial a um protótipo pré-industrial</i>	94
3.4.2.	<i>Sistema de fluídica</i>	95
3.4.3.	<i>Sistema de deteção, equipamento e estruturas microfluídicas</i>	98
3.4.4.	<i>Placa eletrónica de controlo</i>	112
3.4.5.	<i>Firmware de controlo e de interpretação de dados</i>	114
3.4.6.	<i>Reformulação do formato do imunoensaio</i>	122
3.4.7.	<i>Otimização do imunoensaio miniaturizado</i>	125
3.4.8.	<i>Validação do equipamento</i>	132
3.5.	CONCLUSÕES	142
3.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
4.	DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE QUANTIFICAÇÃO DE AZOTO ASSIMILÁVEL EM VINHO	149
4.1.	RESUMO	151
4.2.	INTRODUÇÃO	153
4.2.1.	<i>Importância da determinação de azoto assimilável</i>	153
4.2.2.	<i>Estado da arte na determinação de azoto assimilável</i>	154
4.2.3.	<i>Eléktodos de pH de estado sólido</i>	159
4.2.4.	<i>Enquadramento do trabalho efetuado na determinação de azoto assimilável</i>	160
4.3.	PARTE EXPERIMENTAL	162
4.3.1.	<i>Equipamentos, células eletroquímicas e eléctodos de trabalho</i>	162
4.3.2.	<i>Reagentes e soluções</i>	162
4.3.3.	<i>Síntese da membrana seletiva de iões amónio</i>	164
4.3.4.	<i>Preparação da solução para deposição de óxido de irídio</i>	164
4.4.	RESULTADOS.....	166
4.4.1.	<i>Fabricação e aplicação de um eléctrodo de pH de estado sólido</i>	166
4.4.1.1.	Crescimento de filmes de IrOx em eléctodos de Ouro	168
4.4.1.2.	Otimização das condições eletroquímicas de crescimento de IrOx.....	176
4.4.1.3.	Aplicação de eléctodos de IrOx para a determinação do pH do vinho	182
4.4.1.4.	Preparação de um eléctrodo de ião seletivo de iões amónio de estado sólido	187
4.4.2.	<i>Desenvolvimento de um método de deteção de azoto assimilável por medidas de fluorescência na plataforma Enosense®</i>	193
4.4.2.1.	Estado da arte na determinação de iões amónio e aminoácidos primários através da sua reação com OPA	194
4.4.2.2.	Plataforma Enosense®	196
4.4.2.3.	Deteção de aminoácidos primários em amostras de vinho por fluorescência	196
4.4.2.4.	Deteção de iões amónio em amostras de vinho por fluorescência	207
4.5.	CONCLUSÕES	217
4.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	220
5.	CONCLUSÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS	227
5.1.	CONCLUSÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS	229
ANEXOS		235

Lista de abreviaturas

A/D – Conversor analógico/digital

Anti-OTA-HRP – Anticorpo policlonal de coelho purificado por afinidade específica contra a OTA e conjugado com peroxidase de rábano-de-cavalo (HRP)

APTES – 3-aminopropiltrietoxissilano

BSA – Albumina do soro bovino

CAD/CAM – Desenho assistido por computador/manufatura assistida por computador

CAS – Base de dados da *Chemical Abstracts Service*

CNC – Controlo numérico computadorizado

DC – Corrente contínua

E.U. – União Europeia

EA – Eléctrodo auxiliar

ELISA – Ensaio imunoenzimático em suporte sólido

EMF – Força eletromotriz

Epa – Potencial do pico de oxidação ou anódico

Epc – Potencial do pico de redução ou catódico

EQL – Eletroquimioluminescência

ER – Eléctrodo de referência

Fc-PAH – Hidroclorato de polialilamina modificado com ferroceno

FTIR – Espectrometria de infravermelho médio com transformada de Fourier

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HRP – Peroxidase de rábano-de-cavalo

IDE – Ambiente integrado de desenvolvimento

INESC-MN – Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores - Microsistemas e Nanotecnologias

Ipa – Corrente de pico anódico

Ipc – Corrente de pico catódico

ITO – Óxido de índio-estanho

j – Densidade de corrente

LOD – Limite de deteção

MPS – 3-mercaptopropanosulfonato de sódio

NAC – N-acetil-L-cisteína

NOPA – “Nitrogen by OPA”

OIV – Organização internacional do vinho

OPA – Orto-ftalaldeído
OTA – Ocratoxina A
OTA-BSA – Albumina de soro bovino conjugada com OTA
PAH – Hidrocloro de polialilamina
PBS – Tampão fosfato salino
PDMS – Polidimetilsiloxano
pKa – Valor de pH ao qual 50% das espécies ionizáveis se encontram carregadas
PLA – Ácido polilático
PME – Pequenas e médias empresas
PMMA – Polimetil-metacrilato (nome comum Acrílico)
ppb – Partes por bilhão ($\mu\text{g} / \text{Kg}$)
ppm – Partes por milhão (mg / Kg)
ppt – Partes por trilião (ng / Kg)
ppy – Polipirrolo
PSS – Poliestireno sulfonato de sódio
QL – Quimioluminescência
RPM – Rotações por minuto
RSDRi – Condições de precisão intermédia
SAM – Monocamada auto-organizada
SCE – Eléctrodo saturado de calomelanos
STC – Concentração de rastreio visada
STL – Ficheiro com formato de stereo litografia
SU-8 – Fotoresiste negativo à base de epoxido
SUA – Solução de amostra a analisar
TLC – Cromatografia em camada fina
u.a. – Unidades arbitrárias
Utlz – Utilizador
 $\Delta E_p - E_{pa} - E_{pc}$ = diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico
 λ – Comprimento de onda
 Γ – Cobertura superficial
 v – Velocidade de varrimento

Capítulo 1

Introdução geral e estrutura da
tese

1.1 Introdução geral

O desenvolvimento e aplicação de métodos e técnicas analíticas aplicadas à indústria agroalimentar e das bebidas, tem crescido em paralelo com a preocupação crescente dos consumidores, nomeadamente no que concerne à composição e segurança alimentar.

Por forma a responder a uma exigência gradual dos consumidores e da legislação observa-se uma tendência geral na indústria para a adoção de métodos analíticos que permitam uma resposta rápida e no local, em particular no que respeita ao controlo de matérias-primas e processos de produção [1] [2].

Tal como em outras áreas (e.g. telemóveis, computadores portáteis), também nos dispositivos analíticos se verifica uma propensão para a sua miniaturização, por forma a possibilitarem a realização em pequena escala de operações laboratoriais complexas e automatizadas [3] [4].

A introdução de sistemas miniaturizados poderá desempenhar um papel crucial, representando inúmeras vantagens, tais como:

- (i) *Resposta rápida*: redução do tempo dos ensaios para testes de despiste no local;
- (ii) *Miniaturização*: para a produção de instrumentos portáteis para testes nos locais de produção;
- (iii) *Redução de custos*: em termos de reagentes consumidos e equipamentos (produção em massa);
- (iv) *Capacidade de resposta*: possibilidade de realizar múltiplas análises de uma só amostra;
- (v) *Automatização*: sistema de leitura eletrónicos e comunicação inteligente para sistemas autónomos;
- (vi) *Novas funcionalidades*: combinação possível de diversos sensores e respetiva integração eletrónica;

Dentro da indústria agroalimentar a implementação de sistemas analíticos miniaturizados é particularmente relevante para:

- Controlo de qualidade alimentar [5] [6] [7];
- Segurança alimentar [8] [9] [10];
- Controlo de processo de produção [11] [12] [13];
- Prevenção de fraude [14] [15];
- Conservação e embalagem inteligente [16] [17];

Alinhada com a estratégia de I&D da empresa de acolhimento, a investigação realizada neste trabalho pretende contribuir para o avanço no conhecimento relativo ao desenvolvimento de metodologias e dispositivos analíticos, passíveis de miniaturização, em particular métodos analíticos envolvendo transdução eletroquímica e ótica (absorvância e fluorescência) para aplicação na indústria agroalimentar.

Na secção seguinte, apresenta-se uma revisão bibliográfica sucinta, realçando os aspectos mais relevantes a ter em consideração no desenvolvimento de sistemas

miniaturizados envolvendo biossensores e imunoensaios, em particular envolvendo transdução ótica e eletroquímica.

1.1.1 Biossensores

Nos últimos anos o desenvolvimento de biossensores tem atraído um grande interesse, não só na comunidade científica mas também a nível industrial, essencialmente devido à sua aplicação a um grande número de procedimentos analíticos e pela sua elevada sensibilidade, especificidade e facilidade de uso [18] [19].

Um biossensor é definido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), como: "*um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (recetor bioquímico) que é mantido em contacto directo com um elemento transdutor*" [20]. Assim de acordo com a definição, todos os biossensores são baseados em um sistema de dois componentes: um elemento de reconhecimento biológico que facilita a ligação específica ou a reação bioquímica específica com o analito, e uma unidade de conversão de sinal (transdutor).

Os biossensores podem ser classificados, segundo o elemento biológico ou respetivo transdutor [21]. Desta forma e considerando o elemento biológico podem ser classificados por exemplo: biossensores enzimáticos (enzimas) [22] [23], Imunológicos (anticorpos) [24] e celulares (microorganismos) [25]. Se considerarmos o método de transdução por: óticos [21] [26], electroquímicos (amperométrio, potenciométrico, condutimétrico, etc) [27] [28], gravimétricos [29], calorimétricos [30], entre muitos outros.

Uma outra classificação possível dos biossensores consiste em subdividi-los em dois subgrupos: os biossensores de reconhecimento direto (*label-free*) [31] [32], em que a interação biológica é medida diretamente, e biossensores de deteção indireta, que dependem de elementos secundários para deteção (marcadores).

Biossensores de deteção direta utilizam a medição direta da interação biológica. Tais detetores normalmente medem alterações físicas (por exemplo, alterações nas propriedades óticas, mecânicas, ou elétricas) induzidos pela interação biológica, e que não necessitam de marcação para a deteção [33]. De entre os métodos de transdução em sistemas de deteção diretos, os mais usuais incluem sistemas óticos (sendo o efeito de ressonância de plasmão o mais usado) [34] e sistemas mecânicos [35], tais como osciladores de cristal de quartzo [29].

Para o caso de deteção direta o reconhecimento do ligando desempenha um papel extremamente importante. Embora os recetores mais utilizados sejam anticorpos, outros ligandos estão a ser desenvolvidos, incluindo aptâmeros (ácidos nucleicos de ligação a proteínas) [36] [37] e péptidos [36] [38] .

Biossensores diretos podem também no entanto ser aplicados num modo indireto, tipicamente quando se deseja aumentar a sua sensibilidade. Estes dependem de elementos secundários (marcadores) para a deteção. Exemplos de tais elementos secundários são enzimas (por exemplo, fosfatase alcalina, HRP ou glucose oxidase) [39] [40], marcadores fluorescentes (fluoróforos, *quantum dots*) que melhoram a

deteção de um complexo em sanduíche [41]. Ao contrário dos detetores diretos, que medem diretamente alterações induzidas por interações biológicas e são "livres de marcadores", os detetores indiretos requerem que a biomolécula de reconhecimento seja marcada antes de se ligar ao analíto.

No que diz respeito biossensores miniaturizados é necessário realizar uma distinção entre verdadeiros sistemas miniaturizados, *i.e.* aqueles onde o sistema de reconhecimento e transdução é verdadeiramente miniaturizado e aqueles nos quais o ensaio analítico é miniaturizado mas o sistema de deteção recorre a equipamentos externos complexos e de tamanho convencional.

Na realidade a maioria dos biossensores miniaturizados reportados na literatura recaem nesta ultima categoria. Por exemplo sistemas de deteção de DNA em microarrays com microscópios confocais [42] e câmeras CCD [43]; biossensores baseados em ressonância de plasmão de superfície [44] [45]; biossensores baseados em cantilevers usando microscopia de força atômica [46] [47], fazem uso da miniaturização para melhorar o desempenho do reconhecimento molecular biológico, mas dificilmente são portáteis, de baixo custo e fáceis de usar.

A deteção, em microssistemas analíticos, é um dos principais desafios, uma vez que técnicas de elevada sensibilidade são necessárias como consequência do uso de volumes de amostra muito pequenos, em ambientes de dimensões micro. É tendo em consideração estes constrangimentos que o uso de métodos eletroquímicos e óticos de deteção são particularmente adequados nestes sistemas. Apresentam uma elevada facilidade de miniaturização devido à sua inerente compatibilidade com técnicas de microfabricação, sem uma perda acentuada de desempenho.

Confrontando os dois métodos de eleição, nos métodos de deteção eletroquímica a resposta não está dependente do percurso ótico e turbidez da solução apresentado adicionalmente baixo requerimentos de consumo energético.

Um exemplo de sucesso no desenvolvimento de biossensores óticos miniaturizados, são aqueles que recorrem ao uso de fibras óticas como sonda e superfície de imobilização das biomoléculas, ilustrado na Figura 1.1, revelando uma aplicação crescente em aplicações farmacêuticas, industriais e militares. A facilidade de condução da luz, comprimentos de interação elevados, baixo custo e a capacidade não só de realizar a excitação das moléculas como a recolha simultânea da luz emitida dos alvos, são os principais fatores a favor do uso de fibras óticas em biossensores [48] [49].

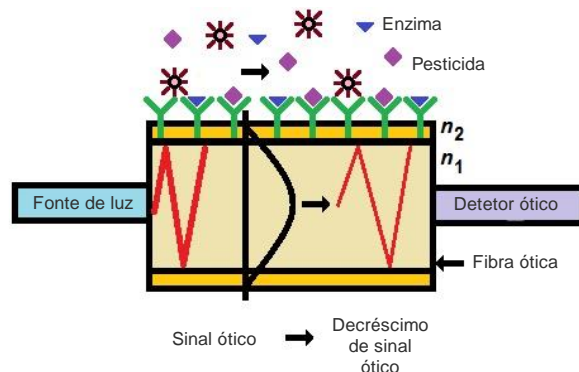


Figura 1.1 – Ilustração de um biossensor para detetar pesticidas recorrendo ao uso de fibras óticas, adaptado de [50].

1.1.2 Imunoensaios

A análise de alimentos com vista à deteção de compostos biológicos (bactérias patogénicas) e contaminantes (e.g. toxinas, pesticidas) é de importância primordial para assegurar a segurança e qualidade dos mesmos.

Nas últimas décadas, o controlo de segurança alimentar tem sido essencialmente efetuado através do controlo do produto, em detrimento do controlo do processo. Estas práticas fazem com que um número elevado de amostras tenham que ser analisadas antes de se poder tomar a decisão, de que um determinado lote de produto é seguro. Além do mais o controlo através do produto final apenas deteta as falhas e não as causas no processo de produção [51].

O controlo de produto em detrimento do controlo de processo é essencialmente devido à lacuna de dispositivos analíticos fiáveis e de resposta rápida, com capacidade de utilização no local de produção. De facto uma grande maioria das análises efetuadas para a deteção de microorganismos ou compostos contaminantes socorre-se de imunoensaios convencionais em ambiente laboratorial, com tempos de espera alargados.

O recurso a imunoensaios tem sido amplamente empregue não só na indústria alimentar mas também em diagnósticos médicos [52], análise farmacêutica e ambiental [53], essencialmente devido à sua simplicidade, sensibilidade e especificidade.

Os imunoensaios são também denominados por ELISA, do termo inglês (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), ou por ensaio imunoenzimático em suporte sólido, e são baseados no princípio da interação específica entre anticorpo e antígeno, o qual lhes confere a sua elevada especificidade [54].

De uma forma geral podemos classificar os formatos de ELISA considerando o meio em que são realizados (homogéneos ou heterogéneos) ou a técnica usada (competitivos vs. não-competitivos), sendo que no formato heterogéneo ainda se podem classificar com base no componente que se encontra imobilizado (direto vs. indireto).

Independentemente da configuração escolhida os ensaios de ELISA são compostos por um sistema de captura, um analito (substância que se pretende detetar) e o sistema de deteção (por exemplo um fotodíodo). Para escolher a configuração mais adequada ao sistema em estudo deve ter-se em conta se se pretende proceder a uma quantificação ou apenas a deteção, o tipo de ligação e o tamanho do antígeno, a sensibilidade e precisão desejada e o tempo disponível para a recolha de dados (31).

Em imunoensaios heterogéneos o anticorpo (ou em alguns casos o antígeno) é imobilizado sobre um suporte sólido, enquanto os ensaios homogéneos se desenrolam inteiramente na fase de solução

Nas figuras seguintes encontram-se representadas esquematicamente as diferentes configurações possíveis para ensaios de ELISA heterogéneos.

- **Formato direto vs. Indireto**

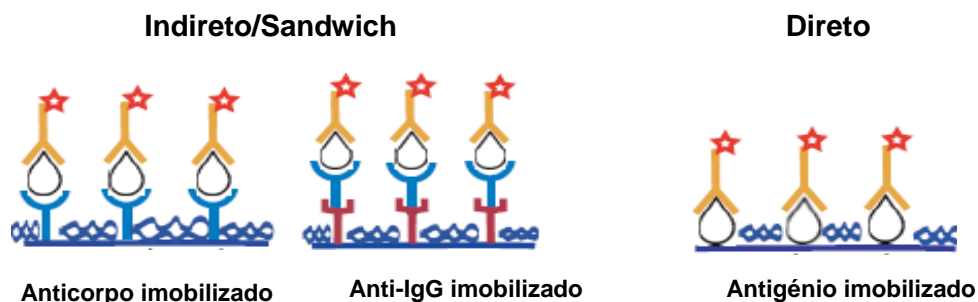


Figura 1.2 – Representação esquemática para imunossaios heterogêneos indiretos e diretos.

- **Formato competitivo vs. não-competitivo**

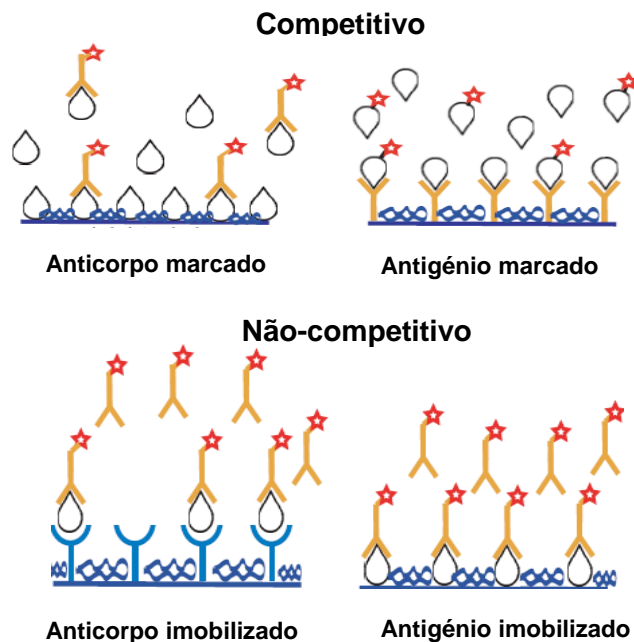


Figura 1.3 – Representação esquemática para imunossaios heterogêneos competitivos e não-competitivos.

Um ponto em comum para a maioria dos imunossaios, consiste na série de passos de lavagem, mistura e incubação envolvidos no processo, os quais são extremamente morosos e consumidores de tempo, fazendo com que um único ensaio necessite de várias horas para ser realizado. A grande maioria do tempo despendido em imunossaios convencionais é essencialmente devido à necessidade de longos tempos de incubação, resultado do ineficiente transporte de massa, assente puramente em fenômenos de difusão. Por este motivo, tem havido um forte investimento na adaptação das metodologias a sistemas miniaturizados.

1.1.3 Sistemas analíticos miniaturizados

Os sistemas analíticos miniaturizados, são também atualmente conhecidos como: “lab-on-chip”, biochips ou por “micro-total-analysis-system” (μ TAS). Podem ser visualizados como versões miniatura de equipamentos laboratoriais convencionais, nos quais é possível realizar protocolos completos envolvendo diversas operações químicas e físicas tais como: pré-tratamento da amostra, transporte de reagentes/produtos, mistura, separação reacional, deteção e recolha de produtos de forma automática num só dispositivo. Para tal diferentes componentes necessitam de ser integrados tais como, microbombas, microreatores, microválvulas, etc. [55].

Um imunoensaio miniaturizado recorrendo a estruturas microfluídicas implica que existam microcanais para o transporte dos líquidos, e com uma parte ou a totalidade dos componentes necessários para a realização do imunoensaio integrados [56] [57] [58].

Métodos analíticos que recorrem à tecnologia envolvendo microfluídica procuram em geral melhorar o desempenho analítico, reduzindo o consumo de reagentes, diminuindo o tempo de análise, melhorando a fiabilidade e sensibilidade através de automação, e integrando múltiplos processos num único aparelho/estrutura microfluídica. Estas características são particularmente adequadas no desenvolvimento de imunoensaios por uma variedade de razões que se passam a enumerar:

- Quantidades de reagentes e amostras

A grande maioria dos anticorpos, marcadores fluorescentes, enzimas e outros reagentes envolvidos nos imunoensaios são dispendiosos, muitas vezes na ordem das centenas de euros por miligrama, e como tal a miniaturização reduz drasticamente estes custos.

- Diminuição do tempo de análise

Uma das grandes desvantagens dos procedimentos típicos em imunoensaios heterogéneos é a realização dos mesmos recorrendo a microplacas. Através da redução da distância de difusão e convertendo tempos de análise para segundos e minutos em vez de horas e dias, os imunoensaios miniaturizados podem no limite ser rápidos o suficiente para monitorizar em contínuo, sem sacrificar a sensibilidade e fiabilidade, e como tal mimetizarem um verdadeiro sensor.

- Automatização

Uma das principais fontes na perda de precisão, em muitos dos procedimentos envolvidos em imunoensaios de bancada, é o simples erro humano. Ao contrário de equipamento robotizados grandes e dispendiosos, procedimentos englobando estruturas microfluídicas podem ser construídas para funcionarem sem qualquer parte móvel sujeita a desgaste, revelando-se relativamente económicos de produzir e operar. O movimento de líquidos pode ser controlado com precisão por *software* conectado a bombas, válvulas, agitadores, etc. De tal forma que cada amostra pode ser analisada sempre de forma idêntica. Medidas precisas, que usualmente requerem um operador especializado, podem ser obtidas pela simples execução de um programa.

- Integração e portabilidade

Os benefícios da miniaturização vão muito além de uma diminuição da escala e volumes usados. A razão da área superficial para o volume pode ser muito maior quando se opera em escala micro, fazendo com que fenómenos de transporte de massa sejam muito mais eficientes. De tal forma que interações químicas entre a superfície e a solução são mais rápidas devido ao percurso para difusão ser bastante menor. Na posse de equipamentos de pequena dimensão, envolvendo estruturas microfluídicas, com capacidade de realizar análises de forma rápida, e no local de recolha da amostra, evita o envio da mesma para laboratórios especializados permitindo um melhor tempo de resposta. Por outro lado como o volume de líquido necessário é bastante baixo, pouca energia é necessária para os manipular. Aliás, de tal forma que é possível recorrer a sistemas passivos que nem sequer requerem o uso de energia externa, funcionando apenas com base em processos de difusão e/ou de capilaridade para controlar o ensaio.

Para o desenvolvimento de imunoensaios, recorrendo a estruturas microfluídicas, tem ainda de se ter em consideração determinados aspetos de ordem tecnológica e práticos como os seguintes enumerados:

- Material de fabrico da estrutura microfluídica.

Além de considerações de ordem prática para o fabrico, a natureza da superfície exposta no canal pode ser de crucial importância devido a elevada razão área/volume associada a estas dimensões.

- Modificação da superfície.

Modificações da superfície do canal é na maioria das vezes necessária quer para prevenir adsorção da amostra e/ou outros reagentes, ou pelo contrário para promover por exemplo a adsorção de proteínas bloqueadores de adsorção não-específica.

- Introdução da amostra/reagentes e descolamento do fluido no canal.

Esta é uma das considerações muitas vezes menosprezada em desenvolvimentos de carácter mais fundamental. No entanto uma estratégia tem de ser bem planeada para realizar a interface entre o mundo em escala macro do laboratório e a microescala do teste.

Apesar de todas estas vantagens, ainda existem atualmente algumas limitações, tais como a formação de bolhas e volumes mortos os quais devem ser tidos em atenção. A inclusão de bolhas pode interromper a continuidade dos líquidos e afetar fortemente o desempenho.

Os aspetos a ter em conta no desenvolvimento de sistemas de microfluídica exigem muito mais estudos de optimização para adaptar os ensaios que tiveram sucesso a uma escala macro.

1.2 Objetivo e estrutura da tese

O objetivo central do projeto de doutoramento visa o estudo e desenvolvimento de sensores analíticos para monitorização de diferentes parâmetros na indústria agroalimentar.

A opção para a ordem de apresentação dos resultados deste trabalho de doutoramento teve como base a sucessão cronológica pela qual os mesmos foram realizados, em linha com os objetivos propostos para a tese e alinhados com a estratégia da empresa Lumisense, Lda.

A tese é constituída por um capítulo com uma introdução geral e sucinta sobre sistemas analíticos miniaturizados, três capítulos com apresentação e discussão dos resultados obtidos e um capítulo final com as conclusões finais e perspetivas futuras, perfazendo um total de cinco capítulos. Os resultados obtidos nos capítulos 2, 3 e 4 assentam no desenvolvimento de tecnologia e metodologias para a determinação analítica de compostos de interesse para a indústria agroalimentar recorrendo a métodos óticos de aquisição. Em virtude da especificidade de cada um dos assuntos discutidos em cada capítulo, optou-se por apresentar em cada um, um pequeno resumo, uma introdução ao tema em estudo, bem como os procedimentos e parte experimental envolvidos e conclusões.

O primeiro capítulo de resultados teve como objetivo o estudo da mediação da reação de eletroquimioluminescência proveniente da reação de oxidação de Luminol/ H_2O_2 recorrendo a um polieletrólito catiónico modificado com ferroceno, tendo em vista a sua aplicação na construção de uma plataforma para aplicação em biossensores óticos à base de eletroquimioluminescência contendo todos os componentes imobilizados.

O capítulo 3 foi desenvolvido tendo em vista a construção de um protótipo pré-industrial para a deteção de Ocratoxina A (OTA) com recurso a um ensaio imunoenzimático em suporte sólido inserido numa estrutura microfluídica. Este trabalho foi realizado no âmbito da participação da Empresa num projecto Europeu denominado Demotox.

Por fim o último capítulo de resultados teve como objetivo a adaptação e desenvolvimento de técnicas de determinação de azoto assimilável para uso no equipamento multiparamétrico desenvolvido pela Lumisense,Lda, parcialmente inserido no projecto nacional Bionitro.

1.3 Referências bibliográficas

- 1 David I. Ellis, Howbeer Muhamadali, Simon A. Haughey, Christopher T. Elliott, and Royston Goodacre. Point-and-shoot: rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis – moving out of the laboratory and into the food supply chain. *Analytical Methods*, 7, 22 (2015), 9401-9414.
- 2 M. D. Luque de Castro, J. González-Rodríguez, and P. Pérez-Juan. Analytical Methods in Wineries: Is It Time to Change? *Food Reviews International*, 21, 2 (2005), 231-265.
- 3 Giuseppe Lippi, Mario Plebani, Emmanuel J. Favaloro, and Tommaso Trenti. Laboratory testing in pharmacies. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48, 7 (2010), 943–953.
- 4 Antonio Calvo-López, Oriol Ymbern, David Izquierdo, and Julián Alonso-Chamarro. Low cost and compact analytical microsystem for carbon dioxide determination in production processes of wine and beer. *Analytica Chimica Acta*, 931 (2016), 64–69.
- 5 Mahdi Ghasemi-Varnamkhasti, Seyed Saeid Mohtasebi, and Maryam Siadat. Biomimetic-based odor and taste sensing systems to food quality and safety characterization: An overview on basic principles and recent achievements. *Journal of Food Engineering*, 100, 3 (2010), 377–387.
- 6 André Müller and Hans Steinhart. Recent developments in instrumental analysis for food quality. *Food Chemistry*, 101, 3 (2007), 1136–1144.
- 7 J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth et al. Biosensors for life quality: Design, development and applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102, 2 (2004), 179–194.
- 8 Marek Piliarik, Lucie Párová, and Jiří Homola. High-throughput SPR sensor for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 5 (2009), 1399–1404.
- 9 Brian S. Ferguson, Steven F. Buchsbaum, James S. Swensen, Kuangwen Hsieh, Xinhui Lou, and H. Tom Soh. Integrated Microfluidic Electrochemical DNA Sensor. *Analytical Chemistry*, 81, 15 (2009), 6503–6508.
- 10 S. R. Nugen and A. J. Baeumner. Trends and opportunities in food pathogen detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008), 451-454.
- 11 Laura Escuder-Gilabert and Miguel Peris. Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, 665, 1 (2010), 15–25.
- 12 Luis Ruiz-García, Loredana Lunadei, Pilar Barreiro, and Jose Ignacio Robla. A Review of Wireless Sensor Technologies and Applications in Agriculture and Food Industry: State of the Art and Current Trends. *Sensors*, 9 (2009), 4728-4750.
- 13 J. Artigas, C. Jiménez, C. Dominguez, S. Minguez, A. Gonzalo, and

- J.Alonso. Development of a multiparametric analyser based on ISFET sensors applied to process control in the wine industry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 89, 1-2 (2003), 199–204.
- 14 E. Abad, F. Palacio, M. Nuin, A. González de Zárate, A. Juarros, J.M. Gómez, and S. Marco. RFID smart tag for traceability and cold chain monitoring of foods: Demonstration in an intercontinental fresh fish logistic chain. *Journal of Food Engineering*, 93, 4 (2009), 394–399.
- 15 A. Regattieri, M. Gamberi, and R. Manzini. Traceability of food products: General framework and experimental evidence. *Journal of Food Engineering*, 81, 2 (2007), 347–356.
- 16 Timothy V. Duncan. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363, 1 (2011), 1–24.
- 17 Ee Lim Tan, Wen Ni Ng, Ranyuan Shao, Brandon D. Pereles, and Keat Ghee Ong. A Wireless, Passive Sensor for Quantifying Packaged Food Quality. *Sensors*, 7, 9 (2007), 1747-1756.
- 18 Saraju P. Mohanty and Elias Kougiannos. Biosensors: A tutorial review. *IEEE potentials* (2006), 35-40.
- 19 Ahmet Koyun, Esma Ahlatcioğlu, and Yeliz Koca İpek. *Biosensors and Their Principles, A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*. InTech, 2012.
- 20 Daniel Thevenot, Klara Toth, Richard Durst, and George Wilson. Electrochemical biosensors:recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, 71, 12 (1999), 2333-2348.
- 21 P.N. Patel, Vivekanand Mishra, and A.S.Mandloi. Optical Biosensors: Fundamentals and Trends. *Journal of Engineering Research and Studies*, 1, 1 (2010), 15-34.
- 22 Zhu L, Yang R, Zhai J, and Tian C. Bionzymatic glucose biosensor based on co-immobilization of peroxidase and glucose oxidase on a carbon nanotubes electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (2007), 528-535.
- 23 Cui Y, Barford JP, and Renneberg R. Amperometric trienzyme ATP biosensors based on the coimmobilization of salicylate hydroxylase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and hexo-kinase. *Sensors and Actuators*, B 132 (2008), 1-4.
- 24 Morgan CL, Newman DJ, and Price CP. Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clinical Chemistry*, 42 (1996), 193-209.
- 25 Rasooly A and Jacobson J. Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2006), 1851–1858.
- 26 Xudong Fan, Ian M. White, Siyka I. Shopova, Hongying Zhu, Jonathan D. Suter, and Yuze Sun. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A

- review. *Analytica Chimica Acta* , 620 (2008), 8-26.
- 27 Dorothee Grieshaber, Robert MacKenzie, Janos Voros, and Erik Reimhult. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* , 8 (2008), 1400-1458.
- 28 Gründler, Peter. *Chemical Sensors : An introduction for scientists and engineers*. Springer,Berlin, 2007.
- 29 P, Skládal. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2003), 491–502.
- 30 Yakovleva M, Bhand S, and Danielsson B. The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 766 (2013), 1–12.
- 31 Jeffrey N. Anker, W. Paige Hall, Olga Lyandres, Nilam C. Shah, Jing Zhao, and Richard P. Van Duyne. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials*, 7, 6 (2008), 442-453.
- 32 Jonathan S. Daniels and Nader Pourmand. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. *Electroanalysis*, 19, 12 (2007), 1239-1257.
- 33 Katrin Schmitt, Bernd Schirmer, Christian Hoffmann, Albrecht Brandenburg, and Patrick Meyrueis. Interferometric biosensor based on planar optical waveguide sensor chips for label-free detection of surface bound bioreactions. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 11 (2007), 2591–2597.
- 34 Maria Soler, M.-Carmen Estevez, Maria de Lourdes Moreno, Angel Cebolla, and Laura M. Lechuga. Label-free SPR detection of gluten peptides in urine for non-invasive celiac disease follow-up. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 15 (2016), 158–164.
- 35 J.L. Arlett, E.B. Myers, and M.L. Roukes. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nature Nanotechnology*, 6 (2011), 203–215.
- 36 Shiping Song, Lihua Wang, Jiang Li, Chunhai Fan, and Jianlong Zhao. Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27, 2 (2008), 108–117.
- 37 Ramos, E, Pheiro, D., Soto, M., Abanades, D.R., Martín, M.E, Salinas, M, and González, V.M. A DNA aptamer population specifically detects Leishmania infantum H2A antigen. *Laboratory Investigation*, 87, 5, 409-416.
- 38 Wenzhe Niu, Nan Jiang, and Yinghe Hu. Detection of proteins based on amino acid sequences by multiple aptamers against tripeptides. *Analytical Biochemistry*, 362, 1 (2007), 126–135.
- 39 Shan, CS, Yang, HF, Song, JF, Han, DX, Ivaska, A, and Niu, L. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on

- Graphene. *Analytical chemistry*, 81, 6 (2009), 2378-2382.
- 40 Jia, JB, Wang, BQ, Wu, AG, Cheng, GJ, Li, Z, and Dong, SJ. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. *Analytical chemistry*, 74, 9 (2002), 2217-2223.
- 41 Wang, YH, Bao, L, Liu, ZH, and Pang, DW. Aptamer Biosensor Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer from Upconverting Phosphors to Carbon Nanoparticles for Thrombin Detection in Human Plasma. *Analytical chemistry*, 83, 21 (2011), 8130-8137.
- 42 Hyukin Kwon, Florent Samain, and Eric T. Kool. Fluorescent DNAs printed on paper: sensing food spoilage and ripening in the vapor phase. *Chemical Science*, 3, 12 (2012), 2542-2549.
- 43 Jin Hyung Lee, Robert J. Mitchell, Byoung Chan Kim, David C. Cullen, and Man Bock Gu. A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 3 (2005), 500–507.
- 44 B.J. Yakes, J. Buijs, C.T. Elliott, and K Campbell. Surface plasmon resonance biosensing: Approaches for screening and characterising antibodies for food diagnostics. *Talanta*, 156-157 (2016), 55–63.
- 45 Hana Vaisocherová-Lísalová, Ivana Víšová, Maria Laura Ermini et al. Low-fouling surface plasmon resonance biosensor for multi-step detection of foodborne bacterial pathogens in complex food samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 15 (2016), 84–90.
- 46 Jin Yan, Wang Kemin, and Jin Rong. Development of novel and sensitive sensors based on microcantilever of atomic force microscope. *Progress in Natural Science*, 16, 5 (2006), 445-451.
- 47 Jianhong Pei, Fang Tian, and Thomas Thundat. Glucose Biosensor Based on the Microcantilever. *Analytical Chemistry*, 76, 2 (2004), 292-297.
- 48 Angela Leung, P. Mohana Shankar, and Raj Mutharasan. A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125, 2 (2007), 688–703.
- 49 Seung-Ho Ohk and Arun K. Bhunia. Multiplex fiber optic biosensor for detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* from ready-to-eat meat samples. *Food Microbiology*, 33, 2 (2013), 166–171.
- 50 Rafael Vargas-Bernal, Esmeralda Rodríguez-Miranda, and Gabriel Herrera-Pérez. *Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides, Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides*. InTech, 2012.
- 51 Tadhg Brosnan and Da-Wen Sun. Improving quality inspection of food products by computer vision—a review. *Journal of Food Engineering*, 61, 1 (2004).

- 52 Konry T, Novoa A, Shemer-Avni Y, Hanuka N, Cosnier S, Lepellec A, and Marks RS. Optical fiber immunosensor based on a poly(pyrrole-benzophenone) film for the detection of antibodies to viral antigen. *Analytical Chemistry*, 77, 6 (2005), 1771-1779.
- 53 Jong-Won Park, Shigeru Kurosawa, Hidenobu Aizawa et al. Dioxin immunosensor using anti-2,3,7,8-TCDD antibody which was produced with mono 6-(2,3,6,7-tetrachloroxanthene-9-ylidene) hexyl succinate as a hapten. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 3 (2006), 409–414.
- 54 Wild, David. *The immunoassay handbook*. Elsevier Science, 2013.
- 55 Arben Merkoçi and Joërg P. Kutter. Analytical miniaturization and nanotechnologies. *Lab on a Chip*, 12 (2012), 1915–1916.
- 56 Ng, Alphonsus H. C., Uddayasankar, Uvaraj, and Wheeler, Aaron R. Immunoassays in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (2010), 991–1007.
- 57 Adam Bange, H. Brian Halsall, William R. Heineman. Microfluidic immunosensor systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2005), 2488–2503.
- 58 Thorsten Verch, Ray Bakhtiar. Miniaturized immunoassays: moving beyond. *Bioanalysis*, 4, 2 (2012), 177–188.

Capítulo 2

Preparação de elétrodos modificados com polieletrólitos para o desenvolvimento de biossensores óticos com base em eletroquimioluminescência

Parte do trabalho apresentado neste capítulo foi objeto das seguintes apresentações na forma de poster:

“Electrochemiluminescence of luminol/H₂O₂ system catalyzed by ferrocenes derivatives in solution on ITO electrode” exposto no XII Iberian Meeting of Electrochemistry & XVI Meeting of the Portuguese Electrochemical Society, Lisboa, **Setembro 2010**.

“Electrochemiluminescence of luminol on a poly(allylamine)ferrocene modified electrode” exposto no 63rd Annual Meeting of International Society of Electrochemistry, Praga, **Agosto 2012**.

2.1 Resumo

Este capítulo consiste na preparação, caracterização e otimização de elétrodos modificados com polieletrólitos, numa metodologia de camada por camada, com o intuito de desenvolver uma plataforma para aplicação em biossensores óticos à base de eletroquimioluminescência contendo todos os componentes imobilizados.

O objectivo deste estudo centra-se na possibilidade de síntese de polieletrólitos contendo grupos ferroceno e grupos luminol na sua estrutura, sua caracterização, deposição e avaliação como elétrodos com vista à construção de uma plataforma, contendo imobilizados, todos os reagentes necessários ao processo de electroquimioluminescência (EQL) de luminol com peróxido de hidrogénio. A introdução de grupos ferroceno visa a possível mediação deste composto na reacção de EQL por forma a evitar a oxidação direta do luminol à superfície dos elétrodos modificados evitando assim a passivação/envenenamento do eléctrodo e consequente diminuição de sinal ótico e fraca reprodutibilidade dos sistemas atuais com os reagentes em solução.

O estudo iniciou-se com a apreciação do comportamento de diferentes derivados de ferroceno na catálise homogénea da reacção de EQL de luminol e peróxido de hidrogénio em meio aquoso básico, de modo a avaliar a sua resposta em solução e poder extrapolar resultados para o trabalho seguinte de imobilização dos reagentes à superfície do eléctrodo.

Foi efetuado um estudo sistemático da influência de determinados fatores tais como pH, força iónica, concentração de reagentes (razão luminol/ferroceno), material de eléctrodo (Ouro e ITO) e método de perturbação eletroquímica no processo de EQL mediado pela oxidação de derivados de ferroceno solúveis em meio aquoso (ferroceno carboxaldeído, ferroceno monocarboxílico, ferroceno dicarboxílico).

Após o estudo com todos os constituintes em solução procedeu-se à modificação de elétrodos de ITO, com o polieletrólito sintetizado com ferroceno (Fc-PAH), e à sua caracterização eletroquímica. Avaliou-se a estabilidade em tampão pH 7 e pH 9, bem como a influência dos aniões presentes no eletrólito, e a montagem das várias camadas de polieletrólito através da técnica camada por camada.

Realizou-se ainda a modificação de superfícies de elétrodos de ouro com uma monocamada de 3-mercaptopropanosulfonato de sódio (MPS) com dupla finalidade de, introduzir uma carga superficial negativa à superfície de eléctrodo, para posterior imobilização electroestática do polímero catiónico, e de avaliar a possibilidade de inibição da oxidação de luminol diretamente na superfície de eléctrodo. Avaliou-se o comportamento do eléctrodo modificado com MPS na adsorção de várias camadas de polieletrólito de carga alternada e a sua resposta na reacção de EQL do sistema de luminol/H₂O₂.

2.2 Introdução

Os biossensores óticos têm-se vindo a revelar uma poderosa ferramenta na deteção e análise em diversas áreas de interesse como investigação biomédica, monitorização ambiental, na indústria farmacêutica, saúde clínica e até mesmo no campo de batalha na deteção de possíveis armas biológicas [1] [2] [3] [4].

Os métodos de deteção óticos apresentam diversas vantagens relativamente a outros mecanismos de transdução: são tradicionalmente seletivos e específicos, são imunes a interferências eletromagnéticas, rápidos e muito sensíveis permitindo a análise numa gama alargada de concentrações (duas a três ordens de grandeza), uma vez que muitas vezes existe dependência linear do logaritmo do sinal ótico com o logaritmo da concentração do composto a detetar (compressão logarítmica) [5].

Em particular os biossensores com base em processos de quimioluminescência fazem uso da emissão de luz de moléculas específicas, quando estas retornam ao seu estado fundamental após terem sido excitadas no decorrer de uma reação química [6]. O processo de emissão de luz é despoletado através do reconhecimento do analito pelo elemento biológico sendo a luz recolhida e quantificada por um detetor ótico.

Eletroquimioluminescência (EQL) é a quimioluminescência gerada pelo relaxamento de moléculas no estado excitado, produzidas a partir de uma reação iniciada por via eletroquímica. A EQL permite combinar as vantagens da quimioluminescência (QL), elevada sensibilidade, baixo sinal de fundo e simplicidade, com a possibilidade de localização espacial, seletividade e controlo temporal sobre a reatividade, que é promovida pela utilização de técnicas eletroquímicas para iniciar a reação de quimioluminescência na superfície do eletrodo [7] [8] [9].

Através do controlo do tempo, a emissão de luz pode ser por exemplo adiada até que os processos das reações catalíticas das enzimas tenha tido lugar. O controlo sobre a posição pode ser usado para confinar a emissão a uma região que se encontra idealmente localizada em relação ao detetor, melhorando a sensibilidade devido ao aumento da razão sinal/ruído [10]. Estes fatos aliados à não necessidade de excitação da amostra com uma fonte externa de luz, permite a construção de sistemas analíticos de baixo custo de implementação, em comparação por exemplo com técnicas tais como fluorescência.

O luminol ou 3-aminofthalhidrazina é um derivado da anilina, cuja estrutura se encontra representada na Figura 2.1, sendo o primeiro e mais importante reagente usado em estudos de eletroquimioluminescência devido à sua elevada eficiência de luminescência.

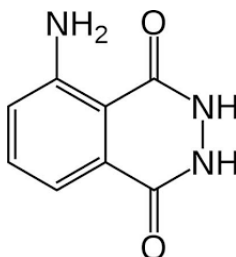


Figura 2.1 – Estrutura do Luminol (3-aminofthalhidrazina).

A reação típica de EQL do luminol com o peróxido de hidrogénio em meio alcalino, ilustrada na Figura 2.2, envolve um primeiro passo de desprotonação do luminol com a formação do anião o qual é subsequentemente electroquimicamente oxidado. A subsequente oxidação, do composto diazo resultante, na presença de peróxido de hidrogénio dá origem ao 3-aminofthalato no estado excitado. Dependendo do potencial aplicado, estão envolvidos na eletrooxidação do luminol diferentes passos mecanísticos. O peróxido de hidrogénio pode participar na forma de anião peróxido, HOO^\bullet , ou como radical superóxido, O_2^\bullet electroquimicamente formado [11] [12] [13] [14] [15].

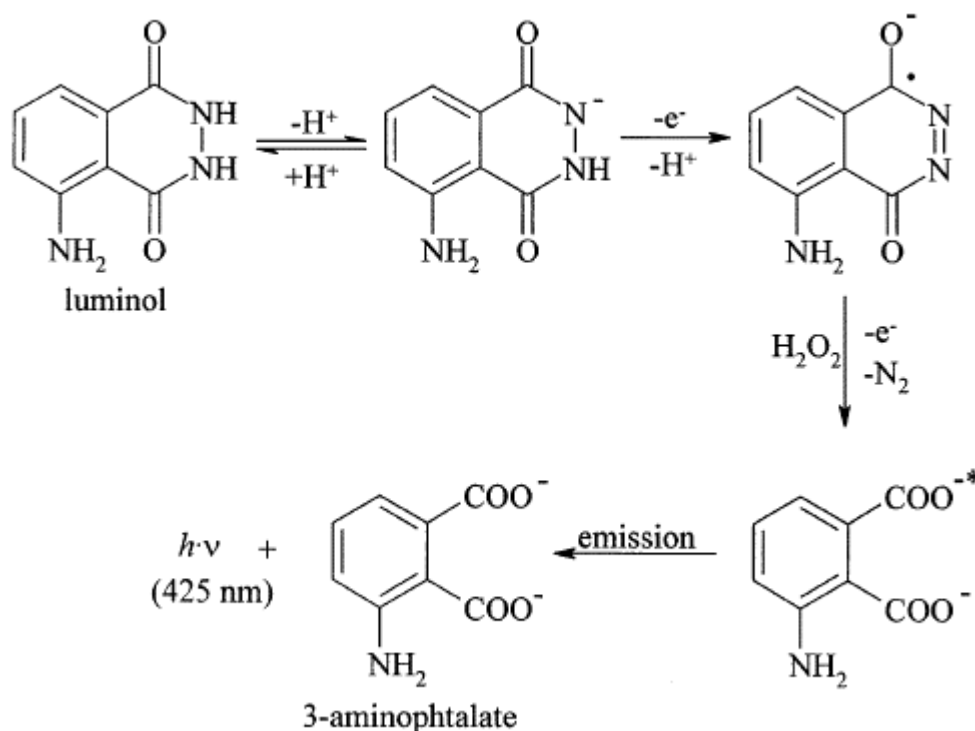


Figura 2.2 – Representação esquemática da reação de EQL do luminol em meio alcalino [7].

Uma das desvantagens detetadas atualmente na aplicação de sistemas de deteção ótica utilizando o processo de oxidação eletroquímica do sistema luminol/ H_2O_2 consiste na passivação observada dos elétrodos, originando a diminuição da intensidade do sinal com o uso contínuo e impossibilitando o nível de reprodutibilidade pretendido [16]. Por outro lado concomitantemente com a EQL proveniente da reação com peróxido de hidrogénio, ocorre também emissão de luz resultante da oxidação de luminol e oxigénio dissolvido em solução. Esta última reação faz com que exista sempre um sinal de fundo que diminui a capacidade de, por exemplo, detetar quantidades sub-nanomolares de peróxido de hidrogénio.

Uma forma de ultrapassar esta limitação consiste no uso de reagentes/condições que intensifiquem o sinal proveniente da reação desejada. Com este objetivo tem sido reportado que a quimioluminescência proveniente da oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio pode ser catalisada na presença de catiões metálicos (Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+}) [17], enzima HRP [18], ou outros compostos contendo ferro [19].

Para o caso particular da intensificação recorrendo a metallocenos, Wilson e Schiffrin em 1996, foram os primeiros a demonstrar que determinados derivados de ferroceno também conseguem catalisar esta reação [20]. A reação catalítica foi estudada com diferentes derivados de ferroceno em solução e também ligados covalentemente a uma proteína, ovalbumina, adsorvida na superfície de um eléctrodo de ITO. Foi relevado que a quimioluminescência é iniciada pela oxidação eletroquímica dos derivados de ferroceno e que a proteína funcionalizada com estes compostos, pode ser detetada com recurso ao sinal proveniente dos processos de EQL. Tais resultados permitiram aos autores avançarem com a possibilidade do uso de ferrocenos como marcadores para imunoenaios.

Na sequência deste trabalho os mesmos autores em 1998 [21] avaliaram o efeito de vinte soluções tampão diferentes com distintos valores de pKa, e quatro materiais de eléctrodo. Após otimização, os melhores resultados foram obtidos na presença de ferroceno dicarboxílico em tampão bis-tris propano num eléctrodo de óxido de índio-estanho (ITO).

Após o trabalho pioneiro de Wilson e Schiffrin, diversos autores estenderam este estudo, através por exemplo do uso de monocamadas auto-montadas em eléctrodos de ouro. Charles E. Taylor *et al.* [22] modificaram eléctrodos de ouro com monocamadas de alcanotóis, de forma, a não só a suprimir a electrooxidação direta do luminol e consequente sinal ótico de fundo, mas também com o intuito de promover a oxidação de certos derivados de ferroceno que medeiem a reação. Os resultados apontam para uma intensificação considerável do sinal em sistemas desenhados de modo a existir uma interação electroestática entre os derivados de ferroceno carregados positivamente e monocamadas com carga oposta, Figura 2.3. Por sua vez, uma repulsão eletrostática é obtida entre o anião de luminol presente na solução e a superfície do eléctrodo, inibindo a oxidação deste à sua superfície. A deteção do derivado do ferroceno pode ser efetuada quer por métodos eletroquímicos quer pela emissão de luz, sendo que a quantificação pelo sinal ótico apresenta superior razão sinal/ruído que a obtida pelas respetivas medidas de correntes.

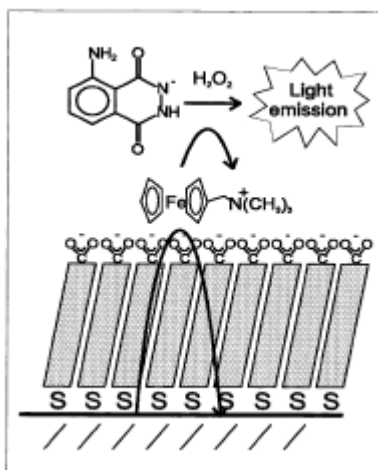


Figura 2.3 – Ilustração do sistema implementado usando o processo de interação electroestática entre o ferroceno, luminol e monocamadas de tióis. Adaptado de [22].

O recurso ao uso de monocamadas para a catálise destes sistemas foi continuado por Yakuri Sato *et al* [23] [24], desta vez utilizando monocamadas contendo na sua

própria estrutura os respectivos centros redox de ferroceno. Neste caso uma monocamada contendo onze átomos de carbono e com grupo cabeça de ferroceno, foi novamente imobilizada na superfície de ouro. Tal como anteriormente verificou-se uma intensificação do sinal ótico tendo neste caso os autores estendido os ensaios à detecção de glucose na presença de glucose oxidase. Também estes autores, tal como os anteriores, reportam que os esquemas de detecção envolvendo reações baseadas em quimioluminescência do luminol com ferroceno, aparentam ter uma razão sinal/ruído superior que os obtidos por detecção amperométrica quando efetuados em condições idênticas.

Já em 2006 o mesmo autor, Y. Sato [25], reporta a comparação entre o uso de elétrodos de ouro modificados com monocamadas contendo grupos ferroceno e polímeros redox contendo o metaloceno, poli(divinilferroceno). Neste caso foi revelado que ambos os sistemas catalisam o processo, no entanto apesar de uma maior quantidade de ferrocenos confinados à superfície pela utilização do filme polimérico, esta não se traduz por um aumento significativo do sinal de EQL comparativamente com o uso da monocamada.

De realçar que este é o único documento, do qual se tem conhecimento, que reporta o uso de um polímero contendo ferrocenos para mediar esta reação, sendo neste caso um polímero redox.

Este fato atesta a originalidade do trabalho aqui proposto, nomeadamente na utilização de polietrólitos contendo grupos ferroceno e sua utilização para a modificação de superfície de elétrodos por forma a mediar a reação de EQL de luminol com peróxido de hidrogénio. Tal como descrito nos trabalhos anteriores, o objetivo é a modificação da superfície com material contendo grupos ferroceno, que intensifiquem o sinal ótico, permitindo uma maior sensibilidade para a aplicação em biossensores óticos. Simultaneamente pretende-se inferir se também a metodologia de modificação por camada por camada com estes polieletrólitos permitem bloquear a electrooxidação direta do luminol no substrato metálico, diminuindo o sinal de fundo. Um estudo detalhado da resposta destas modificações em soluções de diferente pH, permitirá também aferir da sua aplicabilidade em soluções de pH neutro ou ligeiramente acídicas, mais indicadas para um funcionamento das biomoléculas.

Polieletrólitos: definições e propriedades.

Um polieletrólito é definido pela IUPAC como um “Polímero composto de macromoléculas no qual uma substancial porção das suas unidades constituintes contem um grupo iónico ou ionizável, ou ambos” [26].

Os polieletrólitos podem ser sintéticos ou naturais, sendo os ácidos nucleicos, proteínas, alguns polipeptídeos e polissacarídeos exemplos de polieletrólitos naturais¹.

De acordo com a definição anterior um polieletrólito é uma espécie macromolecular que quando colocada em solução aquosa ou outro solvente ionizável se dissocia formando uma molécula polimérica densamente carregada. Esta dissociação é

¹ Os termos eletrólito polimérico e polímero eletrolítico é por vezes usado para polieletrólito. Não devem no entanto ser confundidos com o termo eletrólito polimérico sólido.

normalmente acompanhada pela introdução de contra íões de menor dimensão que tendem a neutralizar esta carga nas unidades repetitivas de forma a preservar a eletroneutralidade. Um polieletrólito, numa solução de força iónica baixa, tende a encontrar-se numa forma mais estendida (linear) devido a repulsão intramolecular das cargas não compensadas de cada unidade monomérica da macromolécula. Em oposição, quando a força iónica da solução é elevada, adota uma estrutura enrolada, consequência da excessiva presença de pequenos contra íões. Esta propriedade dos polieletrólitos permite ajustar parâmetros tais como a espessura, uniformidade, estabilidade e permeabilidade durante a modificação de superfícies com estes polímeros [27] [28].

Processo de auto-montagem camada por camada.

A técnica de auto-montagem por camada por camada foi pela primeira vez mencionada por Iler em 1966 [29]. Em 1991, Decher e Hong [30] [31] expandiram esta técnica demonstrando a sua aplicabilidade à ciência dos materiais. A formação de multicamadas por camada por camada é realizada simplesmente alternando a deposição de polieletrólitos carregados com cargas opostas, de forma que a carga oscila entre positiva e negativa para cada deposição de camada. O processo de deposição é geralmente atribuído a interações electroestáticas entre os polieletrólitos de cargas opostas, sendo no entanto a quantidade e conformação das cadeias adsorvidas dramaticamente dependente dos parâmetros processuais, como referido, em particular da força iónica e pH das soluções de deposição, assim como da densidade de carga de cada um dos polieletrólitos.

Numerosos estudos têm explorado os efeitos da estrutura molecular, substrato, densidade de carga, força iónica pH de disposição, de lavagem e tempo de imersão na estabilidade das multicamadas [32] [33] .

Os resultados demonstram que a estabilidade das multicamadas é extremamente governada em particular pela densidade de carga no polímero e força iónica da solução, sendo a formação destas multicamadas favorecida por densidades elevadas e força iónica baixa.

As forças de ligação nas multicamadas não têm de ser necessariamente de natureza eletrostática. Outras forças, tais como ligações por pontes de hidrogénio [34], ligações de coordenação [35], podem também ser usadas como forças motoras para o processo de auto-montagem.

Como o processo envolve apenas a adsorção a partir de soluções, não existem em princípio, restrições no que respeita ao tamanho e topologia do substrato, tendo sido preparadas multicamadas em colóides [36] e em objetos com alguns centímetros [37]. A deposição de filmes em vidro a partir de simples copos de reação é muito simples podendo ser efetuada quer de forma manual quer automática (Figura 2.4).

A simplicidade do processo fez desta técnica um processo de eleição para a obtenção de eletrodos modificados.

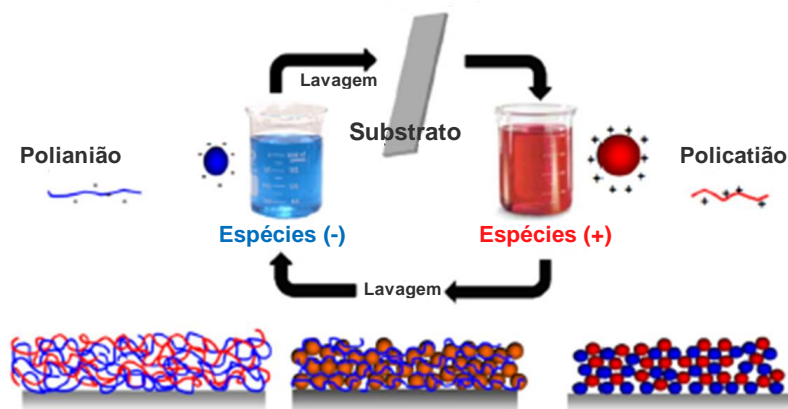


Figura 2.4 – Ilustração esquemática de modificação de superfície de eletrodo utilizando a técnica de camada por camada.

Durante os passos consecutivos de adsorção, o substrato é modificado com polímeros carregados com cargas opostas e entre cada deposição os filmes são normalmente lavados com solvente puro de forma a remover polímero em excesso e evitar contaminações entre as diferentes soluções.

Normalmente, filmes de multicamadas preparados por métodos de camada por camada revelam uma forte interpenetração entre camadas poliméricas de cargas opostas. A interpenetração extensiva entre camadas de polieletrólitos adjacentes é uma propriedade inerente destes sistemas de multicamadas, e informação sobre a extensão de interpenetração é bastante importante no que concerne à construção de superestruturas auto-montadas. Estudos realizados com recurso a medições de refletometria de Raios-X e de neutrões [38] mostram que uma só camada se sobrepõe com aproximadamente quatro camadas adjacentes de ambos os lados. A nova camada de polieletrólito pode, como tal, interagir com material de sete ou oito camadas de filme.

A quantidade de material depositado para um só polieletrólito é auto-limitada uma vez que a repulsão entre polianiões de mesma carga irá limitar a quantidade de material que se ligará ao substrato.

2.3 Parte experimental

2.3.1 Reagentes

Na Tabela 2.1 encontra-se a lista de reagentes utilizados no decorrer do trabalho experimental.

Tabela 2.1 – Reagentes utilizados com o respetivo número CAS e marca do fornecedor.

Reagente	Número CAS	Marca
Luminol	521-31-3	Fluka (98%)
Carbonato de sódio	497-19-8	AcrosOrganics (99.8%)
Bicarbonato de sódio	144-55-8	AcrosOrganics (99.7%)
Perclorato de sódio	7601-89-0	AcrosOrganics (98%)
Ferroceno carboxaldeído	12093-10-6	AcrosOrganics (98%)
Peróxido de hidrogénio	7722-84-1	Merk(30%) (não estabilizado)
Ácido ferroceno monocarboxílico	1271-42-7	Aldrich (97%)
Ácido ferroceno dicarboxílico	1293-87-4	Fluka (97%)
Ferricianeto de potássio	13746-66-2	AcrosOrganics (99%)
Hexacianoferrato(II)-3 hidratado de potássio	14459-95-1	Riedel-de Haen (99%)
Perclorato de sódio	7601-89-0	AcrosOrganics (98%)
Hidrocloreto de polialilamina	71550-12-4	Aldrich (n.d.)
Poliestireno sulfonato de sódio	25704-18-1	Aldrich (n.d.)
3-mercaptopropanossulfonato de sódio	17636-10-1	Aldrich (90%)

2.3.2 Equipamentos

Os ensaios de eletroquímica convencional foram realizadas utilizando um potencióstato modelo Parstat 2253 da empresa *Princeton Applied Research (PAR)* e o sinal ótico adquirido recorrendo a um fotomultiplicador, modelo:H9858 da Hamamatsu conectado ao potencióstato. Para visualização e gravação dos dados usou-se o programa PowerSuite da PAR.

O trabalho experimental foi efetuado dentro de uma caixa de Faraday de modo a minimizar as interferências eletromagnéticas e permitir o isolamento da luz ambiente.

2.3.3 Células eletroquímicas

Para os ensaios em elétrodos de ITO desenharam-se e construíram-se duas células eletroquímicas, uma para os ensaios em fase estacionária (Figura 2.5a) e outra para os ensaios em fluxo (Figura 2.5b). Em ambas as células a aquisição de luz é feita pelo lado do elétrodo que não tem ITO depositado, a transparência do mesmo é uma enorme vantagem deste material de elétrodo.

No primeiro caso (Figura 2.5a), como elétrodo de referência (ER) utilizou-se o elétrodo saturado de calomelanos (SCE), elétrodo auxiliar (EA) um fio de platina (Pt). Para o segundo o caso (b) recorreu-se ao uso de um elétrodo de prata/cloreto de prata, Ag/AgCl como ER, e um tubo de aço inox como EA.

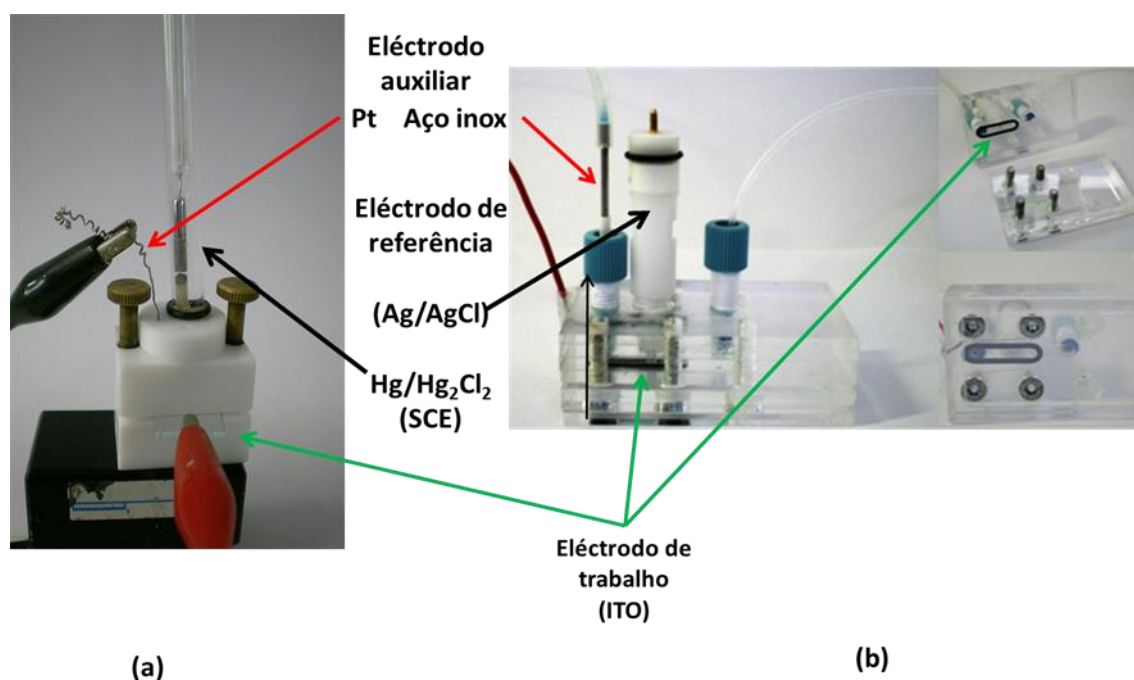


Figura 2.5 – Células eletroquímicas utilizadas nas experiências realizadas com material de elétrodo de ITO, (a) célula usada em estado estacionário e (b) célula de fluxo.

Para o material de elétrodo de ouro (Au) foi necessário construir novas células, tendo em conta a impossibilidade de aquisição de luz através do elétrodo, estando a configuração e o tipo de elétrodos utilizados ilustrados na Figura 2.6.

No caso específico da limpeza e caracterização do elétrodo de ouro da CHInstruments utilizou-se uma célula eletroquímica de três elétrodos; usando-se como elétrodo de referência o SCE e uma folha de platina como elétrodo auxiliar (EA).

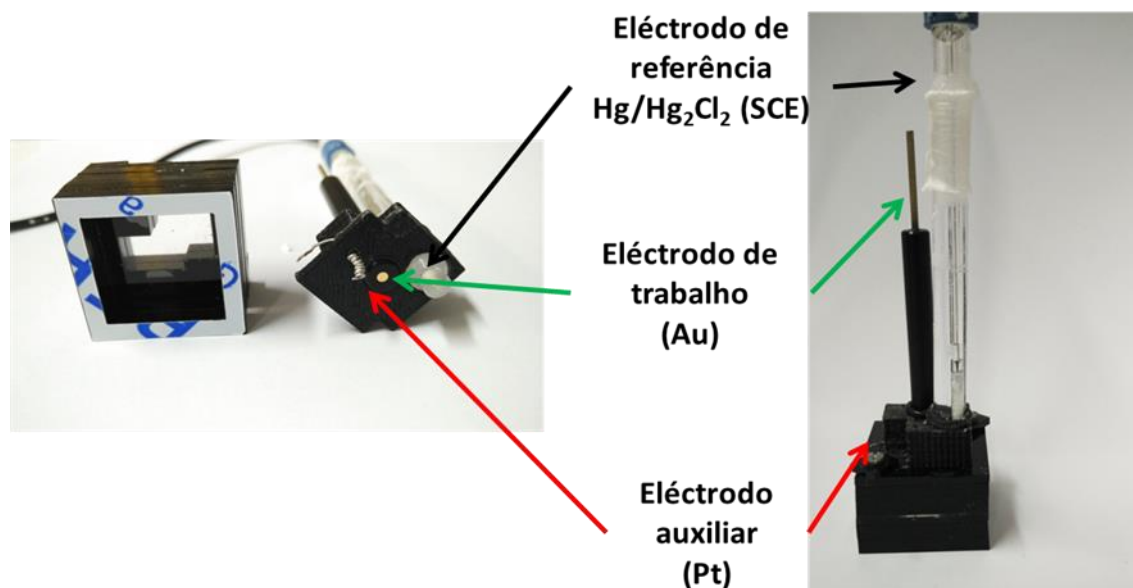


Figura 2.6 – Célula eletroquímica para a realização de ensaios de EQL com material de eléctrodo de Au.

A construção das células eletroquímicas foi levada a cabo na oficina da Lumisense Lda, utilizando como materiais de construção teflon, acrílico (PMMA) e filamento de PLA (ácido polilático) recorrendo a um centro de maquinação computadorizado (cnc) e a uma impressora 3D.

2.3.4 Eléttodos de trabalho

Eléttrodo de óxido de índio-estanho (ITO).

Os substratos para a construção de eléctrodos de ITO foram adquiridos na Sigma Aldrich (referência: 636916) em forma de placas de 75 x 25 mm sob a forma de lamelas de vidro com ITO depositado à superfície com uma espessura entre 600-1000 Å e com uma resistência superficial de 15-25 Ω/cm^2 . Os mesmos foram cortados em retângulos de 12 x 25 mm para a obtenção dos eléctrodos de trabalho pretendidos, com área de trabalho de 0,6362 cm^2 limitada pelo o-ring existente na célula eletroquímica.

A resposta eletroquímica dos eléctrodos de ITO altera-se com a sua utilização, demonstrando-se bastante irreprodutível, facto que levou a que fossem usados somente uma vez para cada ensaio (descartáveis).

Cada eléctrodo sofreu um processo de pré-tratamento e caracterização prévia, por forma a garantir que apresentassem resposta eletroquímica idêntica. Foram tratados por imersão em água-régia muito diluída (20x) durante 1 minuto, seguidos de lavagem em água milliQ, e expostos a ultra-sons em etanol e água milliQ durante 10 minutos cada.

Eléttrodo de ouro.

Utilizou-se o eléttrodo de trabalho de Au policristalino da empresa CHI Instruments, antes de cada ensaio efetuou-se o seguinte procedimento de limpeza: o eléttrodo foi polido num pano de polimento com suspensão de alumina com granulidade decrescente de 1 e 0.3 μm . Após polimento, antes de qualquer experiência, o eléttrodo foi sempre sujeito a limpeza eletroquímica por varrimento de potencial entre -200 e $+1500$ mV vs. SCE numa solução 0.5 mol.dm⁻³ de H₂SO₄ até à obtenção de um voltamograma típico de um eléttrodo de ouro policristalino limpo em meio ácido. O eléttrodo de trabalho tem uma área de 0,0314 cm².

Utilizou-se também placas de ouro com dimensões de 1.1 x 1.1 cm, onde uma camada de ouro com 200 nm foi evaporada em vidro de borossilicato, contendo ainda uma camada intermédia de crómio (2 - 4 nm) para aumentar a sua aderência ao vidro (marca Arrandee™). A limpeza destas superfícies foi realizada em três passos: i) imersão numa solução piranha (1:3 H₂O₂:H₂SO₄) para remover compostos orgânicos; ii) aquecimento à chama para promover a orientação preferencial (111) e iii) 20 min numa câmara de UV para remoção de impurezas.

Como para o caso particular dos eléttrodos de ITO não existe uma resposta típica destas superfícies para avaliar da sua limpeza, em oposição ao eléttrodos de Au, decidiu-se caracterizar ambos na presença de um par redox típico.

Assim sendo o estado da superfície dos diferentes eléttrodos foi avaliado, antes de cada ensaio, analisando a resposta eletroquímica por voltametria cíclica do par redox, [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻. Na Figura 2.7 encontram-se voltamogramas cíclicos típicos registados para os eléttrodos de ITO e ouro.

Dos voltamogramas cíclicos registados retirou-se a posição do potencial de pico de oxidação (E_{pa}) e redução (E_{pc}) e as suas intensidades assim como a separação existente entre ambos os processos (ΔE_p). Uma vez que a área geométrica dos eléttrodos não é idêntica, de modo a permitir uma correta comparação e visualização dos voltamogramas na mesma escala, os resultados são apresentados em densidade de corrente.

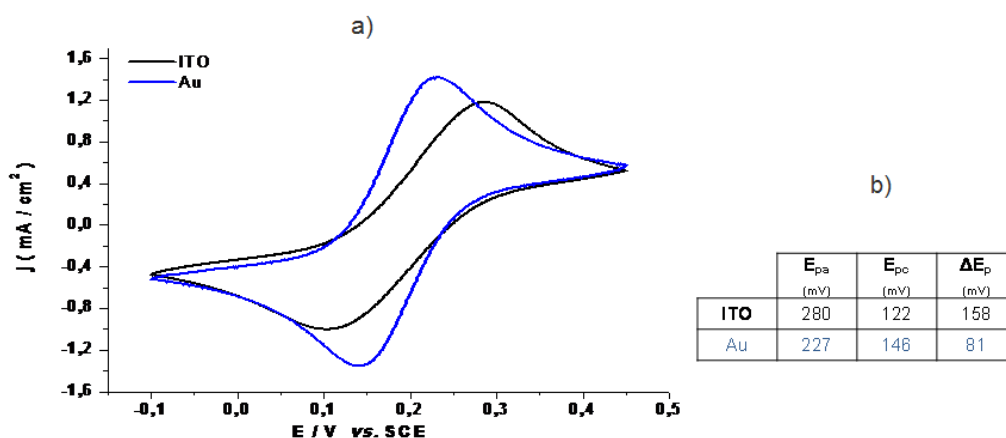


Figura 2.7 – Voltamogramas cíclico (a) de 5mM de [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ com 0,1M de NaClO₄ v = 50 mV/s em ITO e Au, e respetiva tabela (b) com os valores de potencial de pico anódico e catódico e diferença entre eles, ΔE_p .

Para o eletrodo de ITO, os resultados considerados satisfatórios para o uso dos mesmos foram os seguintes: $E_{\text{oxidação}} = 271 \pm 10 \text{ mV}$; $E_{\text{oxidação}} - E_{\text{redução}} = 150 \pm 10 \text{ mV}$

O afastamento dos picos apresenta uma grande disparidade em relação ao valor teórico para um par redox com transferência de 1 eletrão, 59 mV, contudo para este tipo de superfície de eletrodo, após diferentes métodos de limpeza e várias tentativas nunca se conseguiu obter melhores resultados do que $150 \pm 10 \text{ mV}$.

Para o ouro, obtém-se boa reprodutibilidade, com E_{pa} a cerca de 230 mV e um ΔE_p de aproximadamente 80 mV.

2.3.5 Síntese do polieletrólito funcionalizado com grupos ferroceno

A síntese do polímero de polilalilamina funcionalizado com ferroceno, foi efetuada de acordo com o procedimento experimental descrito na literatura por Calvo *et. al.* [39]. O ferroceno carboxaldeído, 8mg, foi dissolvido em 5 ml de metanol sendo esta solução adicionada gota-a-gota, durante um espaço temporal de uma hora, a 30 ml de uma solução de 40 mg de hidrocloreto de polilalilamina em metanol, contendo 0.26 ml de trimetilamina. Esta mistura é então agitada durante mais uma hora a temperatura ambiente para garantir que a reação ocorre completamente. Após este tempo a mistura é arrefecida a 0°C, à qual é adicionada, lentamente, pequenas porções de NaBH_4 durante 90 minutos. Por fim promove-se a secagem do produto de reação recorrendo ao rota-vapor, 35°C, durante o tempo necessário para remoção do solvente. A extração do resíduo é realizada com água destilada, sendo esta solução aquosa purificada recorrendo a uma membrana de diálise contra água.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Estudos em solução da eletroquimioluminescência de luminol na presença de derivados de ferroceno

Tal como mencionado na introdução o objetivo do trabalho consiste na procura de condições que promovam o processo de electroquimioluminescência do luminol sem que ocorra o processo direto de oxidação do mesmo à superfície do eletrodo. De acordo com o reportado na literatura tal poderá ser atingido recorrendo à utilização de derivados de ferroceno em solução, os quais são oxidados à superfície do eletrodo a potenciais inferiores aos requeridos para a oxidação do luminol. O ferroceno oxidado, ferricinium (Fc^+), por sua vez despoleta a reação de quimioluminescência entre o luminol e o peróxido de hidrogénio [20] [21].

O estudo do comportamento de derivados de ferroceno na catálise da reação de EQL de luminol e peróxido de hidrogénio em meio básico aquoso, foi realizado de modo a inferir do seu comportamento, uma possível resposta dos mesmos quando imobilizados, por recurso a polieletrólitos modificados, à superfície do eletrodo. Particular ênfase foi prestado à influência do material de eletrodo, pH da solução, natureza do derivado, força iónica da solução e razão entre as concentrações finais de luminol e derivados de ferroceno.

Para a escolha dos derivados de ferroceno passíveis de mediar a reação de electroquimioluminescência e serem posteriormente incorporados em polieletrólitos, teve-se em consideração a sua disponibilidade comercial, solubilidade e estabilidade em meio aquoso, apresentando simultaneamente grupos funcionais com capacidade de ligação covalente aos polieletrólitos em estudo.

Desta forma procuraram-se derivados de ferroceno contendo grupos carboxílicos ou aldeídos, os quais permitem a sua ligação posterior a aminas presentes nos polieletrólitos. A Figura 2.8 mostra as estruturas químicas dos derivados selecionados.

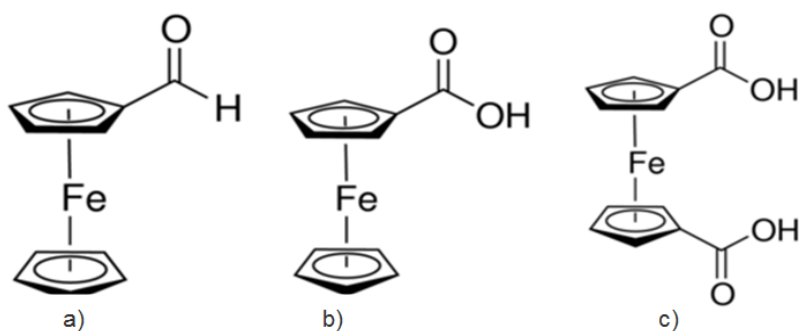


Figura 2.8 – Estruturas químicas dos derivados de ferroceno selecionados. a) Ferroceno carboxaldeído; b) Ferroceno monocarboxílico e c) Ferroceno dicarboxílico.

2.4.1.1. Influência do material de eléctrodo (ITO e ouro)

Para o estudo da influência do material de eléctrodo, ITO ou ouro, na reação de oxidação do sistema de luminol/ H_2O_2 em meio alcalino, usou-se a técnica de voltametria linear. Na Figura 2.9a e Figura 2.9b apresentam-se os sinais óticos recolhidos durante a reação de EQL, enquanto que na Figura 2.9c e Figura 2.9d, mostram-se os valores de correntes inerentes aos diferentes voltamogramas lineares adquiridas em simultâneo com o sinal ótico, para os vários mediadores redox.

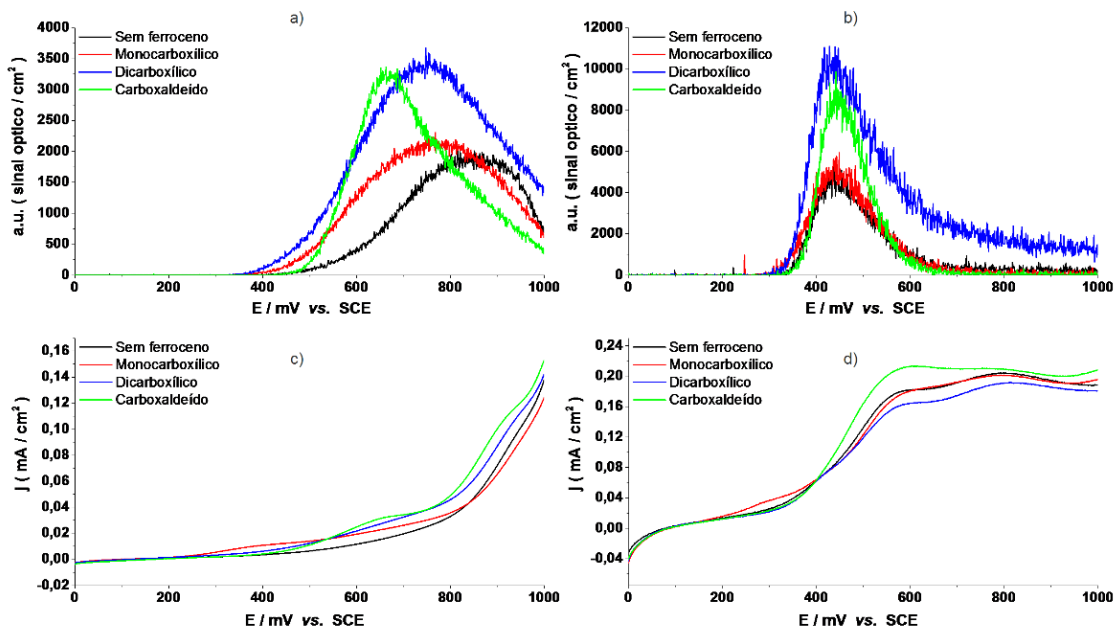


Figura 2.9 – EQL do sistema de 50 μM de luminol com 500 μM de H_2O_2 na ausência de ferroceno (preto) e na presença de 100 μM de ferroceno monocarboxílico (vermelho), ferroceno dicarboxílico (azul) e ferroceno carboxaldeído (verde) em tampão carbonato/bicarbonato pH 9 com 0,1M NaClO_4 , em ITO (a) e Ouro (b), e os respetivos voltamogramas lineares em ITO (c) e ouro (d), $v = 20 \text{ mV/s}$.

Através da análise do sinal ótico resultante da perturbação eletroquímica imposta por voltametria linear, Figura 2.9a e Figura 2.9b, e dos valores de intensidade de sinal observados (Tabela 2.2), é possível afirmar que as respostas são bastante dependentes dos materiais de eléctrodo. No eléctrodo de ITO, Figura 2.9a, a presença de derivados de ferroceno na reação do sistema luminol/ H_2O_2 faz com que não só o potencial ao qual ocorre a emissão de luz se desloque para valores menos positivos (menor sobrepotencial) como ainda se observa um aumento no sinal ótico obtido, em comparação com o resultado obtido na ausência de derivados de ferroceno. Em contraste, no eléctrodo de ouro, Figura 2.9b, o potencial ao qual se observa o máximo de sinal ótico é independente da presença da natureza do derivado de ferroceno, sendo no entanto a magnitude deste sinal dependente da presença e tipo de derivado de ferroceno.

Tabela 2.2 – Tabela com os valores de potencial de pico para o sistema luminol/H₂O₂ na presença e ausência de derivados de ferroceno.

Sistema luminol/H ₂ O ₂	E _p EQL (mV)		Sinal ótico (a.u.)	
	ITO	Au	ITO	AU
Sem ferroceno	847	436	1897	4830
Ferroceno monocarboxílico	765	438	2165	5121
Ferroceno dicarboxílico	750	434	3396	10054
Ferroceno carboxaldeído	669	437	3221	8591

Os voltamogramas lineares no ouro, Figura 2.9d são sempre caracterizados pelo aparecimento de dois picos anódicos, sensivelmente a 550 mV e 800 mV, atribuídos aos processos de oxidação do luminol, sendo o primeiro correspondente à formação da diazoquinona e o segundo proveniente da oxidação do grupo amina dando origem a um radical catião [40] [41]. Não se observa no ouro o aparecimento nítido das correntes associadas à oxidação dos diferentes derivados de ferroceno. As intensidades de correntes registadas na presença dos diferentes mediadores não correspondem às diferenças de intensidade de sinal ótico observadas. Tal observação poderá ter como origem o facto de em ouro o processo de oxidação eletroquímica dos grupos ferroceno ser substancialmente mais rápido que a subsequente reação química dos iões ferricinium formados com os reagentes em solução, não se observando como tal, neste espaço temporal, uma correspondência entre as correntes e o sinal ótico. O facto dos picos de oxidação se encontrarem a valores de potenciais muito próximos, justifica o aparecimento do sinal ótico, ao mesmo potencial, na ausência e presença de ferroceno.

As correntes registadas nos voltamogramas em ITO, Figura 2.9c, corroboram as intensidades e posição do sinal de eletroquimioluminescência. Apesar de as correntes de oxidação do luminol não estarem bem definidas, é possível distinguir entre os potenciais a que ocorre a oxidação do luminol e aqueles onde ocorre a oxidação dos diferentes mediadores. É de notar que no elétrodo de ITO não é possível visualizar os dois picos característicos de oxidação eletroquímica do luminol.

No ITO as correntes envolvidas na oxidação dos mediadores são substancialmente inferiores às registadas no elétrodo de ouro, nas mesmas condições, o mesmo se observando com os respetivos sinais óticos.

Uma primeira análise dos resultados, permite seleccionar o ferroceno dicarboxílico como o composto mais promissor, apesar de não ser o que apresenta menor sobrepotencial para o máximo de EQL, demonstra ser o que inicia a reação a potenciais menos positivos e apresenta também o maior acréscimo do sinal ótico, este resultado vem de encontro com o reportado na literatura [21].

Uma vez que o desempenho dos mediadores depende de várias condições, ter-se-ão que estudar outros parâmetros para a optimização do sinal.

De acordo com os objectivos pretendidos neste trabalho, no que concerne à utilização de mediadores redox, e face aos resultados obtidos com o elétrodo de ouro

os derivados de ferroceno em solução não apresentam qualquer vantagem adicional para processos nesta superfície de elétrodo. O valor de potencial ao qual se observa o processo de EQL é exatamente o mesmo na presença ou na ausência destes compostos.

Deste modo para os estudos posteriores foram apenas realizados em elétrodos de ITO.

2.4.1.2. Influência do pH e do mediador

É reconhecido no estado da arte que a electroquimioluminescência do sistema de luminol/ H_2O_2 é bastante dependente do pH da solução [42], como consequência é também esperado uma dependência do sistema mediado.

Para demonstrar esta dependência com o pH, na Figura 2.10a e Figura 2.10b, apresentam-se os resultados obtidos em soluções com diferentes pH, na ausência de mediador.

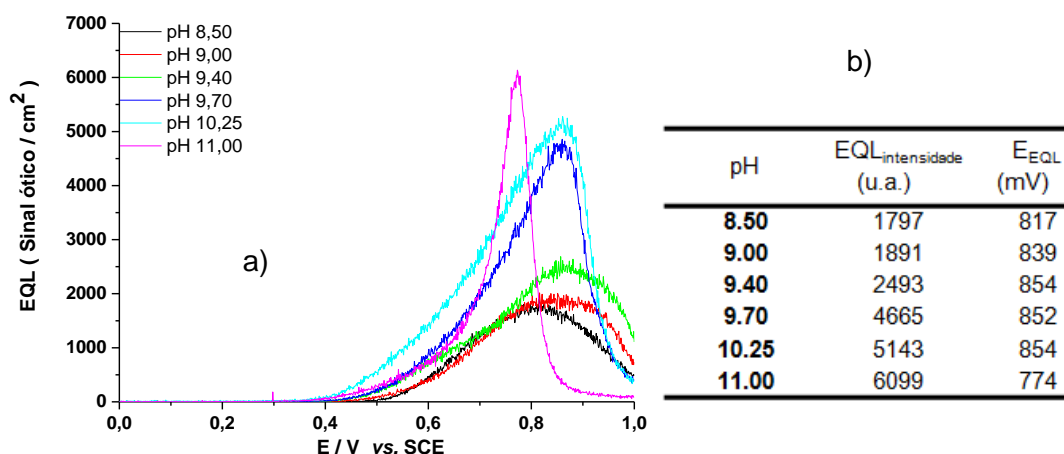


Figura 2.10 – (a) EQL do sistema de 50 μM de luminol com 500 μM de H_2O_2 na ausência de ferroceno, a) em tampão carbonato/bicarbonato com 0.1M NaClO_4 , em ITO, $v = 20 \text{ mV/s}$, (b) respetiva tabela com os resultados resultantes da análise da figura.

De assinalar que não só a magnitude do sinal ótico é fortemente dependente do pH da solução como também o é o valor de potencial ao qual se observa o máximo de sinal. É também interessante observar que a forma dos picos e o potencial ao qual se regista a subida do sinal é igualmente bastante dependente do pH da solução.

Ensaio idênticos realizados na presença dos diferentes mediadores encontram-se ilustrados na figura seguinte, Figura 2.11.

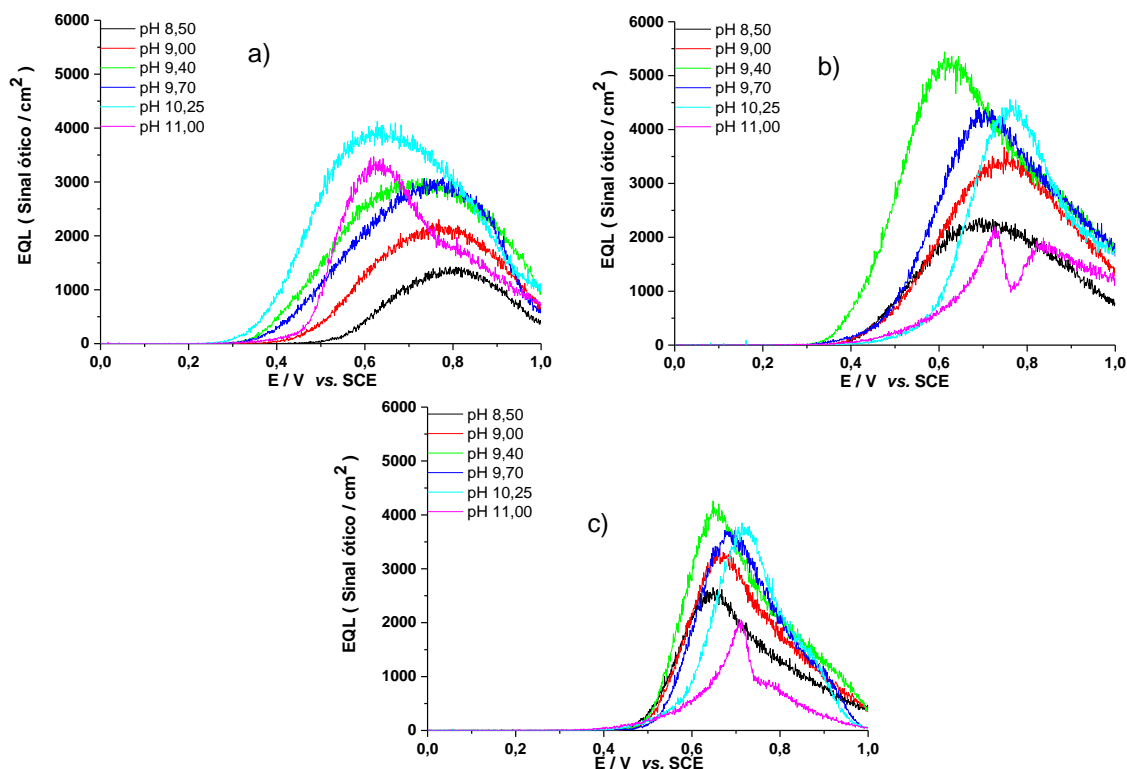


Figura 2.11 – EQL do sistema de 50 μM de luminol com 500 μM de H₂O₂ na presença de 100 μM de, ferroceno monocarboxílico (a) ferroceno dicarboxílico (b) e ferroceno carboxaldeído (c), em tampão carbonato/bicarbonato com 0.1M NaClO₄, em ITO, ν = 20 mV/s.

Tal como para o sistema na ausência de derivados de ferroceno (Figura 2.10), também o pH da solução tem um impacto significativo na intensidade do sinal e valor de potencial ao qual se inicia ou regista o máximo de luz emitida pela reação mediada pelos diferentes derivados. Da análise dos resultados é visível que a intensidade de sinal aumenta com o respetivo aumento de pH da solução para o intervalo entre 8.5 e 9.4, independentemente do derivado testado. Para valores superiores de pH esta variação já não é concordante entre os diferentes compostos.

Para a uma melhor interpretação dos resultados, a variação do sinal ótico e potencial do pico com o pH, para os diferentes ferrocenos, encontra-se compilada em representação gráfica na Figura 2.12.

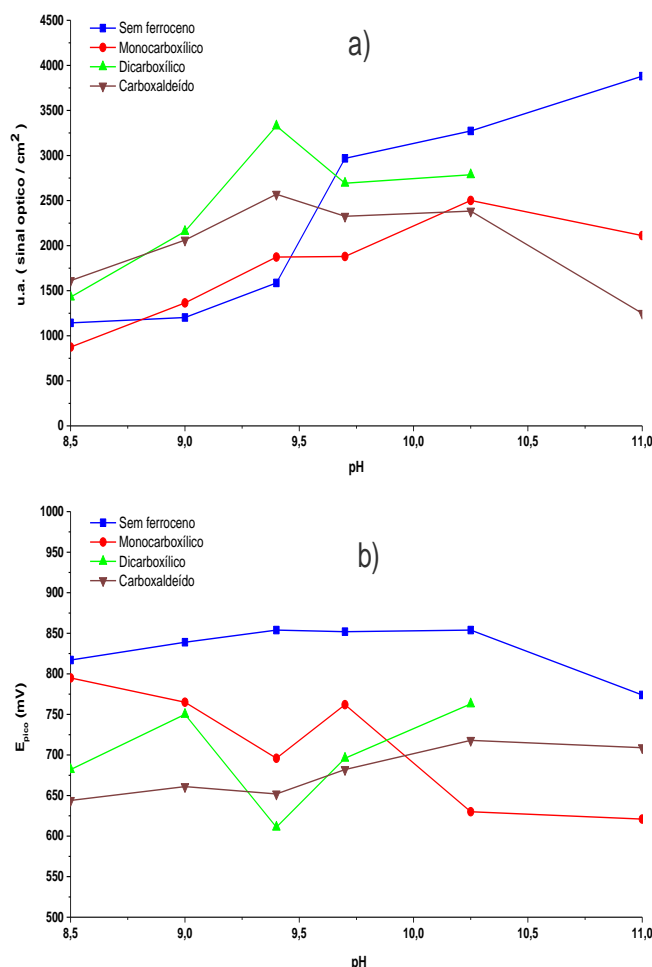


Figura 2.12 – (a) Relação entre a intensidade do sinal ótico obtido e o pH, (b) relação entre o potencial de EQL e o pH; para os ensaios realizados com 50 μ M de luminol, 500 μ M de H₂O₂, na ausência de ferroceno (linha a azul), na presença de 100 μ M dos vários derivados de ferroceno; força iônica de 0.1M de NaClO₄.

Verifica-se pela observação da Figura 2.12a que os derivados de ferroceno intensificam o sinal ótico proveniente do EQL sensivelmente até ao pH 9.4, e que acima deste valor, o sistema sem mediador apresenta sinal superior. Quando a reação ocorre na presença de um dos derivados de ferroceno e independentemente do pH de trabalho é sempre catalisada, *i.e.* o potencial ao qual ocorre o máximo de intensidade de luz é sempre inferior quando na presença de ferroceno comparando com o sistema contendo apenas luminol (Figura 2.12b).

Um fator crucial para a escolha do melhor derivado, é a diferença entre o potencial do pico de EQL do sistema não catalisado e o do potencial do pico do sistema catalisado, assim sendo, os resultados que apresentam uma diferença maior foram os obtidos na presença de ferroceno dicarboxílico a pH 9.4 a par com os recolhidos na presença de ferroceno monocarboxílico a pH 10.25, com diferenças de 243 e 224 mV respetivamente.

Entre os dois mediadores, a escolha reverte a favor do ferroceno dicarboxílico de acordo com a seguinte interpretação: observando os valores de intensidade ótica adquiridos para o sistema a pH 10.25, verifica-se que para o mesmo valor de pH o sistema não catalisado apresenta maior potencial de pico de EQL que o sistema catalisado com monocarboxílico, ao invés, ao pH 9.4 o sistema com dicarboxílico apresenta um aumento significativo na intensidade do sinal ótico em relação ao sistema não catalisado. Juntamente com o argumento anterior, a obtenção de maior EQL a pH mais baixo também é muito vantajoso, uma vez que todo o sistema tende a ser implantado em conjunto com elementos biológicos, que têm mais afinidade a pH próximos do neutro (pH 7). Deste modo considera-se que o ferroceno dicarboxílico é o derivado que melhor catalisa a reação do luminol/ H_2O_2 a pH 9.4 e aumenta a intensidade do sinal ótico.

2.4.1.3. Influência da força iônica

A influência da força iônica da solução na reação de luminol/ H_2O_2 com e sem mediador foi também alvo de estudo. Utilizou-se como eletrólito o NaClO_4 , uma vez que apresenta respostas de correntes mais definidas para o estudo dos diversos ferrocenos devido a formação de pares iônicos entre o anião perclorato e o cátion ferricinium, enquanto que os eletrólitos contendo íons cloreto reagem rapidamente com o ferricinium, tornando a resposta menos estável [43] [44].

Foram estudadas as seguintes concentrações de eletrólito: 0.05; 0.1; 0.2; 0.3 e 0.5 M de NaClO_4 , em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.4. Os resultados obtidos para as diferentes concentrações de NaClO_4 são apresentados na Figura 2.13, primeiro para o sistema sem mediador, Figura 2.13a e em seguida para o sistema catalisado pelo ferroceno dicarboxílico, Figura 2.13b.

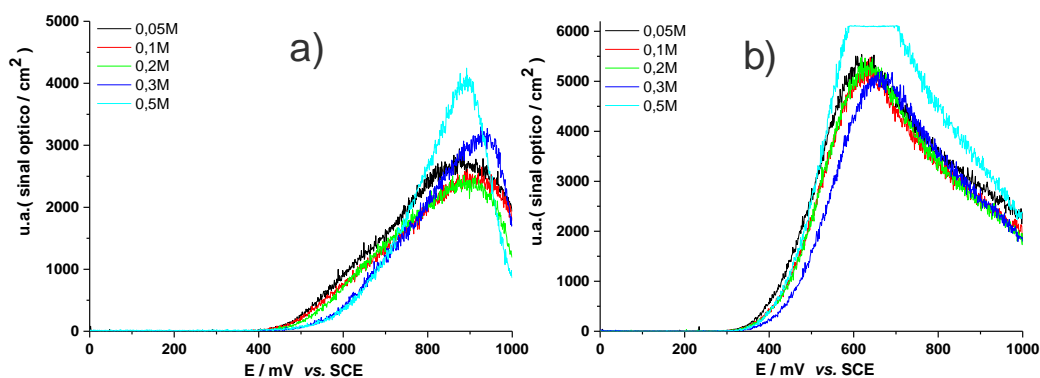


Figura 2.13 – (a) EQL de 50 μM de luminol com 500 μM de H_2O_2 , com 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 e 0.5 M de NaClO_4 , e (b) EQL de 50 μM de luminol, 500 μM de H_2O_2 e 100 μM de ferroceno dicarboxílico, com diferentes concentrações de NaClO_4 , em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.4, $v = 20$ mV/s.

Pela análise da Figura 2.13, verifica-se uma reduzida influência da força iônica na EQL da reação com e sem mediador. Apenas para concentrações de 0.5 M de NaClO_4 se observa alguma influência no sinal ótico registado, não sendo no entanto essa alteração em termos de potencial justificativa para o uso de uma concentração tão

elevada de eletrólito. Como tal os restantes ensaios foram realizados com concentração de eletrólito de 0.1 M.

O fato de não existir uma forte dependência do sinal obtido com a força iônica abre perspectivas para manipular este fator, de modo a ajustar parâmetros tais como a espessura, uniformidade e estabilidade de elétrodos modificados com polieletrólitos contendo grupos ferroceno, sem impacto significativo no sinal ótico obtido.

2.4.1.4. Influência da razão entre luminol e derivado de ferroceno

O estudo da razão da concentração de luminol com a concentração de ferroceno dicarboxílico foi efetuado mantendo a concentração de luminol em 50 μM e fazendo variar a concentração de ferroceno dicarboxílico nas razões de 1 para 0.2; 0.4; 1; 2; 4; 10; 18 e 20, e avaliado através da análise do sinal ótico proveniente da reação de EQL, como se pode verificar na Figura 2.14.

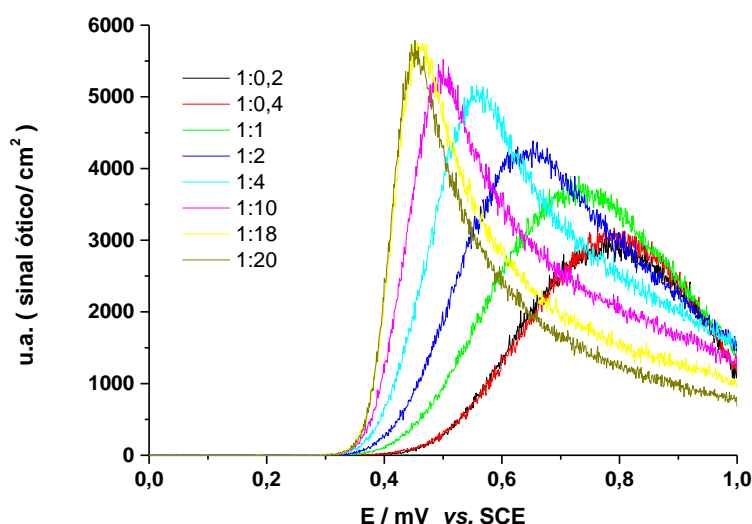


Figura 2.14 – EQL do sistema de luminol/ H_2O_2 , 50 μM e 500 μM respetivamente com concentração variável de ferroceno dicarboxílico de 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 900 μM e 1000 μM , em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.4 com 0,1M de NaClO_4 e $v = 20 \text{ mV/s}$.

Os resultados obtidos permitem-nos verificar que a concentração de ferroceno dicarboxílico usada até ao presente estudo (1:2, luminol:mediador), necessitava de otimização, e que os resultados que eram vistos como encorajadores para este trabalho, na realidade podem ser ainda melhores.

Os resultados indicam que é necessário usar 20 vezes a concentração de ferroceno de modo favorecer a oxidação do luminol ao potencial de oxidação do mediador. A impossibilidade de dissolução de mais que 1 mM de ferroceno dicarboxílico em meio aquoso levou a que não fossem experimentadas razão superiores a 1:20.

Estes resultados permitem antever que a deposição de uma quantidade de ferroceno cada vez mais elevada na superfície do elétrodo, através de montagem por camada por camada, levará a uma intensificação do sinal ótico registado e uma

deslocação ao potencial que tal processo ocorre, para menores valores de sobrepotencial.

2.4.1.5. Processo de EQL por aplicação de pulsos de potencial

Tendo por base todo o estudo anterior de otimização das condições experimentais, na figura seguinte (Figura 2.15), comparam-se os resultados de EQL obtidos na ausência de ferroceno e nas condições otimizadas de acordo com os resultados anteriores.

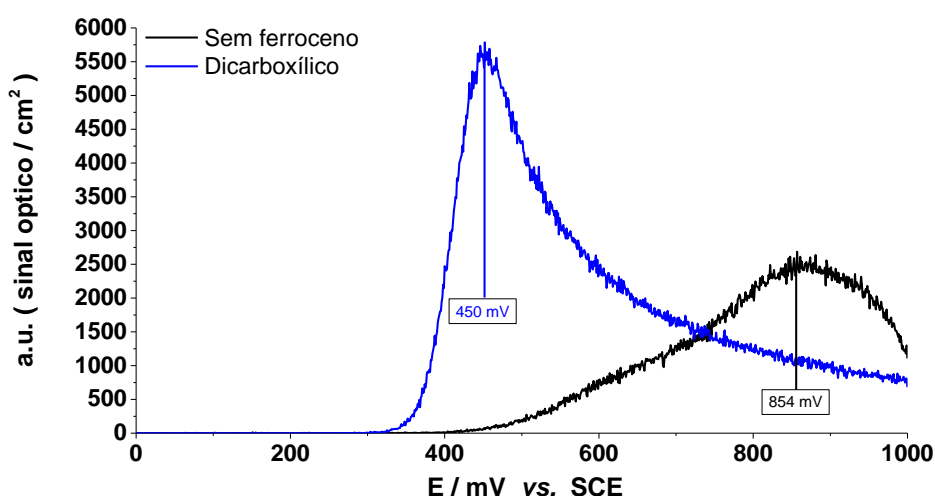


Figura 2.15 – EQL do sistema de luminol/ H_2O_2 , 50 μM e 500 μM respetivamente na ausência de ferroceno dicarboxílico, e na presença de 1000 μM , em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.4 com 0.1M de NaClO_4 e $v = 20 \text{ mV/s}$.

A partir da figura observa-se que a reação entre o luminol e o H_2O_2 foi mediada em aproximadamente 400 mV em relação à reação na ausência de mediador. Não só o sobrepotencial necessário para que a mesma tenha lugar é inferior, como se verifica uma intensificação do sinal em dobro.

Da Figura 2.16, onde se encontram registados os sinais obtidos por aplicação de um pulso de potencial de 0 mV para 450 mV vs. SCE numa solução com e sem ferroceno, fica demonstrado que a reação é iniciada pela oxidação do metaloceno em solução.

Observa-se um pico de sinal ótico de intensidade na ordem dos 6000, reproduzível com o observado na Figura 2.15, e a completa ausência de sinal quando realizado sem o ferroceno no meio reacional.

Este resultado demonstra também que a utilização destes mediadores permite a obtenção de uma elevada razão sinal/ruído, tal como já tinha sido descrito para estes sistemas.

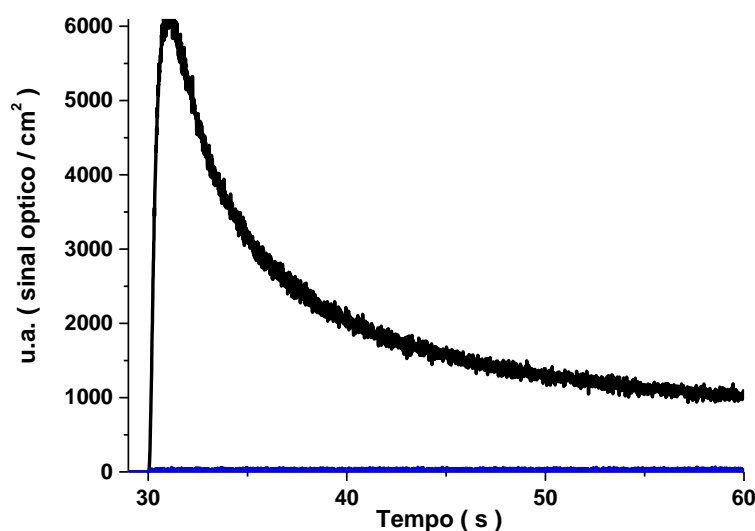


Figura 2.16 – EQL do sistema de luminol/H₂O₂, 50 μM e 500 μM, respetivamente, em resposta à aplicação de pulso de potencial de E₁= 0 V, T₁= 30 s a E₂= 0.45 V, T₂= 30s, sem mediador (linha a azul), e com ferroceno dicarboxílico 1000 μM (linha a preto), em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.4 com 0.1 M de NaClO₄.

O perfil do sinal ótico, variação da intensidade de sinal com o tempo, assemelha-se em tudo com a variação de corrente registada em cronoamperometria para a variação de corrente com o tempo, equação de Cottrell [45].

Para um eléctrodo plano esta relação é dada por:

$$i = \frac{nFAc_j^0 \sqrt{D_j}}{\sqrt{\pi t}} \quad (2.1)$$

onde,

i = corrente, em amperes

n = número de eletrões envolvido

F = constante de faraday, 96,485 C/mol

A = área do eléctrodo planar, em cm²

c_j^0 = concentração inicial do analito, em mol/cm³

D_j = coeficiente de difusão da espécie, em cm²/s

t = tempo em s

A intensidade do sinal medido, quer corrente quer intensidade ótica, depende portanto da velocidade a que o analito, ferroceno, se difunde para o eléctrodo, isto é, a resposta é controlada por difusão.

Após o estudo sistemático dos diversos parâmetros, decidiu-se aplicar pulsos consecutivos de potencial ao sistema na ausência e na presença de mediador, de modo a verificar a mais-valia do mediador quanto à estabilidade no sinal ótico obtido a partir da EQL do sistema luminol/ H_2O_2 . Na ausência de mediador aplicaram-se 20 pulsos de 0 a 0.8 V, fazendo a passagem de fluxo entre cada pulso de modo a renovar a solução e a minimizar interferentes que se possam produzir no processo de oxidação. Realizou-se um ensaio nas mesmas condições para o sistema na presença de ferroceno dicarboxílico, aplicando-se contudo um pulso de 0 a 0.45 V, os sinais óticos obtidos apresentam-se na Figura 2.17.

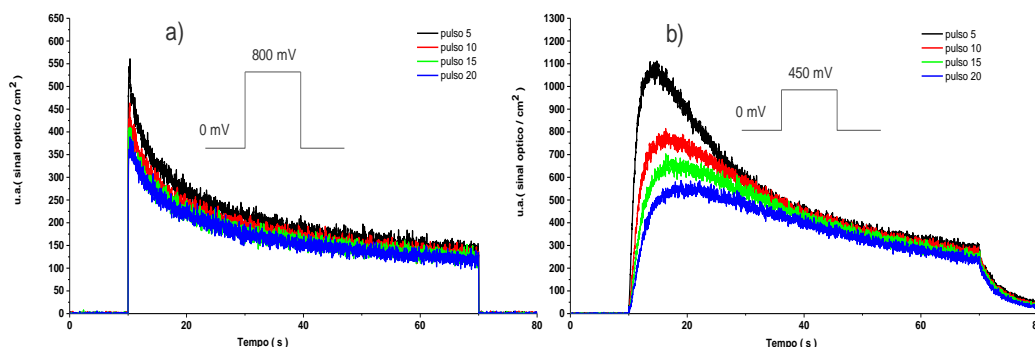


Figura 2.17 – (a) Sinal de EQL obtido para o sistema luminol/ H_2O_2 , 50 μM e 500 μM respetivamente, e (b) do mesmo sistema na presença de 1mM de ferroceno dicarboxílico, ambos de acordo com o perfil de potencial indicado em cada figura. Tampão carbonato/bicarbonato pH 9.4 com 0.1 M de NaClO_4 .

Se interpretarmos os resultados com base apenas na estabilidade do sinal obtido, na ausência e na presença do mediador, concluiremos que a presença deste é desfavorável no que concerne à estabilidade do sinal em pulsos consecutivos. O sistema na ausência de ferroceno perdeu 27% de sinal do primeiro para o último pulso enquanto o sistema na presença de mediador perdeu 37%.

Com base na experiência adquirida na limpeza e caracterização dos elétrodos de ITO, a sua resposta eletroquímica é extremamente dependente do estado superficial da mesma. Os resultados parecem indicar que para o caso dos ensaios na presença de ferroceno, uma pequena alteração do estado superficial, por exemplo adsorção de produtos da reação, estão na origem de uma alteração drástica da cinética de elétrodo, respeitante à oxidação do ferroceno.

Esta eventual sensibilidade da superfície espera-se que seja colmatada com a imobilização do mediador à sua superfície.

Para avaliar se a superfície pode ser regenerada pelas simples troca da solução original os mesmos ensaios foram realizados em fluxo e apresentados no ponto seguinte.

2.4.1.6. Processo de EQL em fluxo

Tal como anteriormente em estado estacionário, os ensaios executados em fluxo, 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, foram realizados na presença e ausência de mediador, utilizando a técnica de voltametria cíclica e a técnica de aplicação de pulsos de potencial. Na Figura 2.18a é apresentada a resposta do sistema sem mediador à perturbação do eletrodo por voltametria cíclica a 10 mVs^{-1} com 10 ciclos consecutivos de 0 a 1 V. A Figura 2.18b apresenta o mesmo ensaio mas com adição do mediador. Em ambas as figuras só são apresentados os varrimentos anódicos.

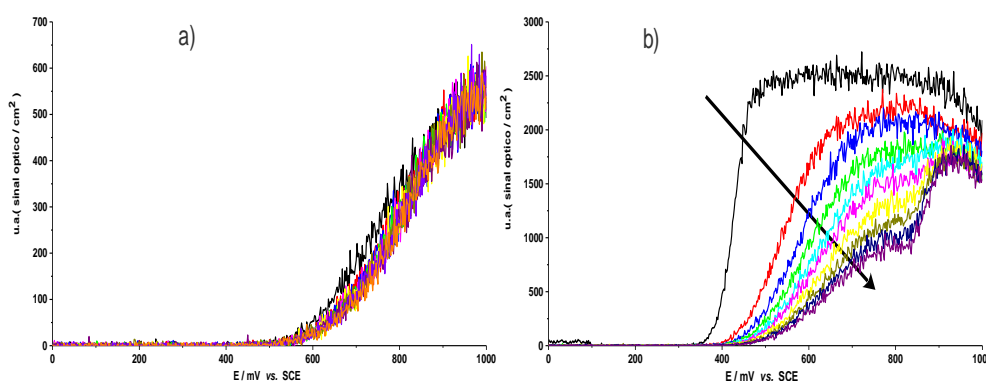


Figura 2.18 – EQL em fluxo do sistema de luminol/H₂O₂, 50 μM e 500 μM respetivamente, (a) na ausência de mediador e na presença (b) de 1mM de ferroceno dicarboxílico, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.4 com 0.1M de NaClO₄ e $v = 10 \text{ mV/s}$, são apresentados 10 ciclos consecutivos de varrimento de potencial.

Uma primeira análise da figura anterior aponta para que mesmo os testes realizados em fluxo, o sinal ótico é aparentemente mais estável na ausência de mediador em oposição aos resultados reunidos na presença do mesmo.

A diminuição sucessiva de sinal ótico, com o varrimento cíclico de potencial, para o ensaio na presença de mediador poderá no entanto estar simplesmente relacionada com a forte dependência da oxidação do ferroceno com o estado da superfície do eletrodo. Uma vez que os ensaios são realizados até valores de potencial (1 V vs. Ag/AgCl) onde ocorre concomitantemente a oxidação de luminol à superfície, um pequeno envenenamento do eletrodo levará a uma diferença significativa na capacidade de oxidação do mediador em solução e consequentemente a uma severa diminuição do sinal ótico.

De realçar que o sinal ótico recolhido em fluxo e na presença de mediador apresenta no varrimento anódico um patamar de sinal, para valores superiores aos necessários à oxidação no eletrodo deste derivado de ferroceno. Este resultado indica que o processo de oxidação está nestas condições controlado por fenómenos de transferência de carga, uma vez que o transporte de massa é bastante rápido imposto pelo fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ de solução à sua superfície.

A observação de que no varrimento inverso de potencial, o sinal ótico não se sobrepõe ao inicialmente registado no varrimento anódico, suporta a hipótese anteriormente levantada de uma alteração da superfície do material de eletrodo.

É de destacar ainda a diferença significativa na magnitude do sinal ótico observado na presença de ferroceno face ao ensaio na ausência do mesmo, o qual mesmo após a diminuição brusca com o varrimento sucessivo ainda é substancialmente superior ao apresentado na sua inexistência. Este aumento significativo de sinal ótico poderá ser bastante importante no futuro, pois permitirá o uso de detetores óticos mais pequenos e suscetíveis de usar em sistemas miniaturizados tais como fotodíodos, em vez dos atualmente empregues e dispendiosos: tubos fotomultiplicadores.

Em seguida é apresentada a compilação de resultados obtidos pela aplicação de pulsos em fluxo (100 $\mu\text{L}/\text{min}$), Figura 2.19, onde se expõe os valores do sinal ótico, em percentagem, em relação ao primeiro pulso, de modo a permitir visualizar a estabilidade de sinal durante 15 pulsos de potenciais consecutivos. De realçar que neste caso a imposição de potencial para o sistema mediado se restringiu a 0.45 V de modo a minimizar a eventual alteração da superfície do eletrodo de acordo com o acima descrito.

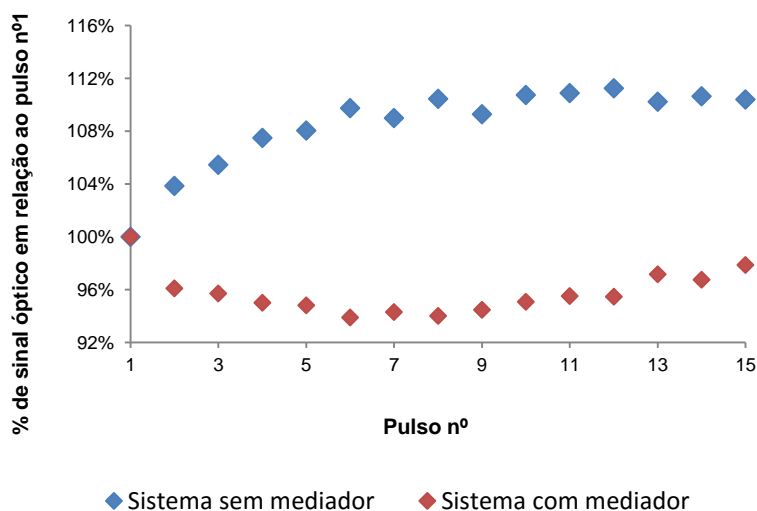


Figura 2.19 – Representação gráfica da % de sinal ótico em relação ao primeiro pulso em função do número de pulsos no sistema sem mediador de 0 a 0.85 V e no sistema com ferroceno dicarboxílico de 0 a 0.45 V. A concentração de luminol/ H_2O_2 é 50 μM e 500 μM respetivamente, e 1mM de ferroceno dicarboxílico aquando o uso de mediador, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.4 com 0.1 M de NaClO_4 , fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Da análise da figura anterior retira-se que para o sistema sem ferroceno existe uma diferença significativa entre o primeiro e o último pulso, cerca de 12 %, sendo o perfil caracterizado por um aumento inicial substancial nos primeiros 6 ciclos para depois se atingir um patamar onde se apresenta estável. Este aumento de sinal é inesperado e poderá ser resultado de uma ativação eletroquímica do eletrodo de ITO como sequência da aplicação consecutiva de pulsos de potencial a 0.85 V em solução básica contendo H_2O_2 , nomeadamente pela ocorrência dum aumento significativo da rugosidade do eletrodo [46] [47].

Para o sistema contendo ferroceno, o perfil de variação caracteriza-se por um ligeiro decréscimo nos pulso iniciais, 3% em cinco pulsos, seguido de uma estabilização do sinal (5-10⁰ pulsos) e finalmente um ligeiro aumento nos últimos pulsos.

2.4.2 Caraterização e aplicação de polieletrólitos catiónicos funcionalizados com ferroceno na modificação de elétrodos

Dependendo do tipo de monómeros carregados, os polieletrólitos podem ser divididos em duas subclasses: fortes e fracos. Os polieletrólitos fortes possuem um grupo ionizável que lhes confere carga num largo intervalo de pH. Por oposição, polieletrólitos fracos são apenas parcialmente carregados neste intervalo e a sua carga parcial pode ser modificada alterando o pH da solução. De fato, o seu grau de ionização é dado pelo seu valor de pKa, *i.e.* o valor de pH ao qual 50% dos monómeros com grupos ionizáveis se encontram carregados.

Na Figura 2.20 encontram-se representados as estruturas químicas dos polieletrólitos usados neste subcapítulo: Poliestireno sulfonato de sódio (PSS) e Hidrocloreto de polialilamina (PAH).

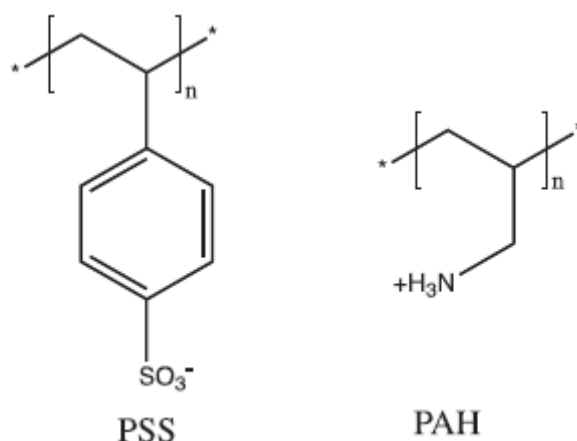


Figura 2.20 – Estruturas químicas dos polieletrólitos usados nestes estudos.

Para formar uma estrutura de camada por camada, o pH da solução de deposição tem de ser ajustado, de tal modo que seja superior ao pKa dos grupos aniónicos (o pKa dos grupos sulfónicos no PSS é de cerca de 1 [48], mas inferior ao pKa dos grupos catiónicos (o pKa dos grupos amina das cadeias laterais do PAH é de 9.5) [49]. Selecionando por exemplo uma solução com valor de pH 5, ambos os grupos estão ionizados e participam na interação eletrostática.

2.4.2.1. Caraterização do polieletrólito catiónico funcionalizado com ferroceno (Fc-PAH)

O procedimento detalhado da síntese do polieletrólito polialilamina, funcionalizado com grupos ferroceno encontra-se na parte experimental, sendo baseado no artigo publicado por Calvo *et. al.* em 1997 [39]. Na figura seguinte encontra-se ilustrada, de forma simplificada, o mecanismo global envolvido na respetiva síntese.

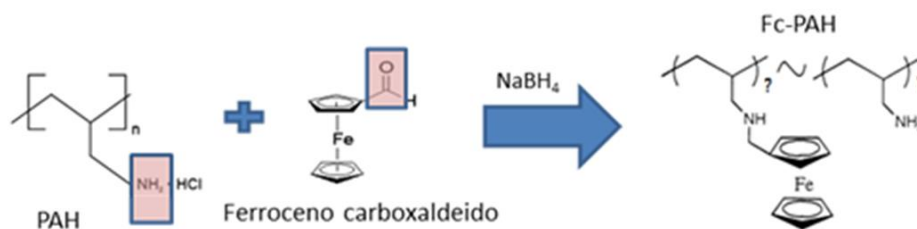


Figura 2.21 – Ilustração da reação de síntese de modificação do polieletrólito com ferroceno.

De uma forma simplificada o procedimento consiste na adição nucleofílica de uma amina primária a um aldeído seguido de redução do grupo imina ($\text{R}_2\text{C}=\text{NR}$) a amina por um agente redutor (NaBH_4).

Previamente à caraterização eletroquímica dos elétrodos modificados com estes polieletrólitos, avaliou-se a possibilidade de quantificação dos grupos ferrocenos presentes na cadeia dos polímeros, após a sua síntese, recorrendo ao registo dos seus espectros de absorção em solução.

O espectro de absorção UV-VIS de uma solução de ferroceno carboxílico, com concentração de 0.1 mM em água, encontra-se apresentado na Figura 2.22a. É possível identificar diferentes bandas de absorção localizadas a 229, 275, 354 e 460 nm. De acordo com o reportado na literatura a quantificação da quantidade de ferro nestes polímeros deveria ser possível realizar através de um pico localizado a 440 nm, partindo de uma curva de calibração usando o mesmo composto em solução [39].

Perante a reconhecida elevada reatividade de grupos ferroceno, efetuou-se também o registo de espectros com diferentes tempos de preparação da solução, após preparação e com 30, 60, 90 e 120 minutos (Figura 2.22b), por forma a avaliar se existiria decomposição do mesmo com o tempo de preparação. Os resultados indicam não existir qualquer degradação significativa com o tempo de preparação da mesma.

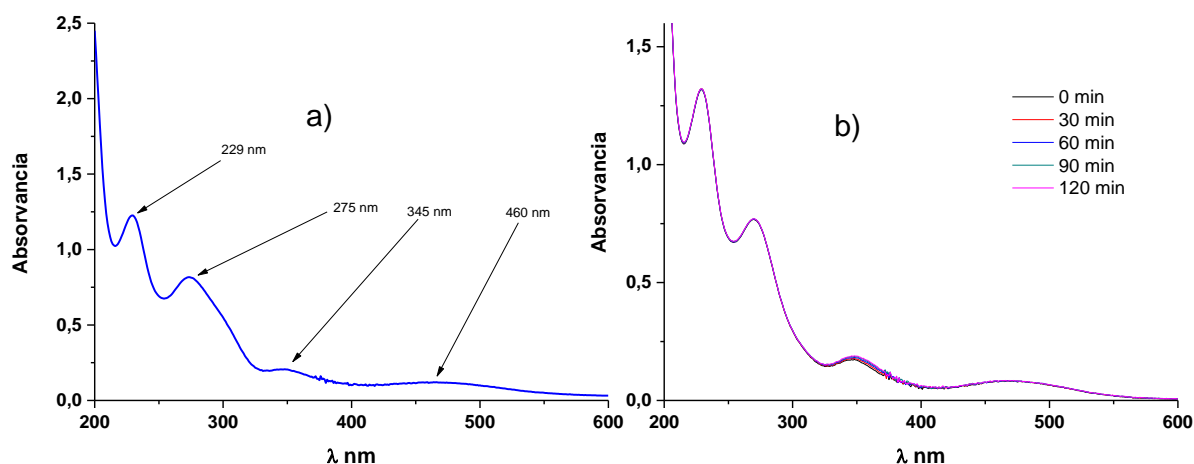


Figura 2.22 – Espectro de absorção da solução de ferroceno carboxaldeído com concentração de 8.33×10^{-5} M; (a) apresentação dos possíveis picos de identificação do composto e respectivos comprimentos de onda, (b) estabilidade do composto com o tempo em água.

Tendo como base de partida os resultados anteriores efetuou-se uma curva de calibração fazendo variar a concentração de ferroceno carboxaldeído em solução.

De modo a calcular a gama de concentrações em que deve ser realizada a curva de calibração, utilizou-se a seguinte premissa:

A solução resultante do rota-vapor é solubilizada em 2 mL, se a reação tiver rendimento de 100%, a concentração de ferroceno carboxaldeído em solução é de 0.018M, o ensaio no espectrofotómetro é feito com diluição de 100x, logo a concentração mais elevada na curva de calibração será próxima de 0.00018M (1.8×10^{-4} M), e o limite inferior foi efetuado para estar próximo do 1-2% de rendimento.

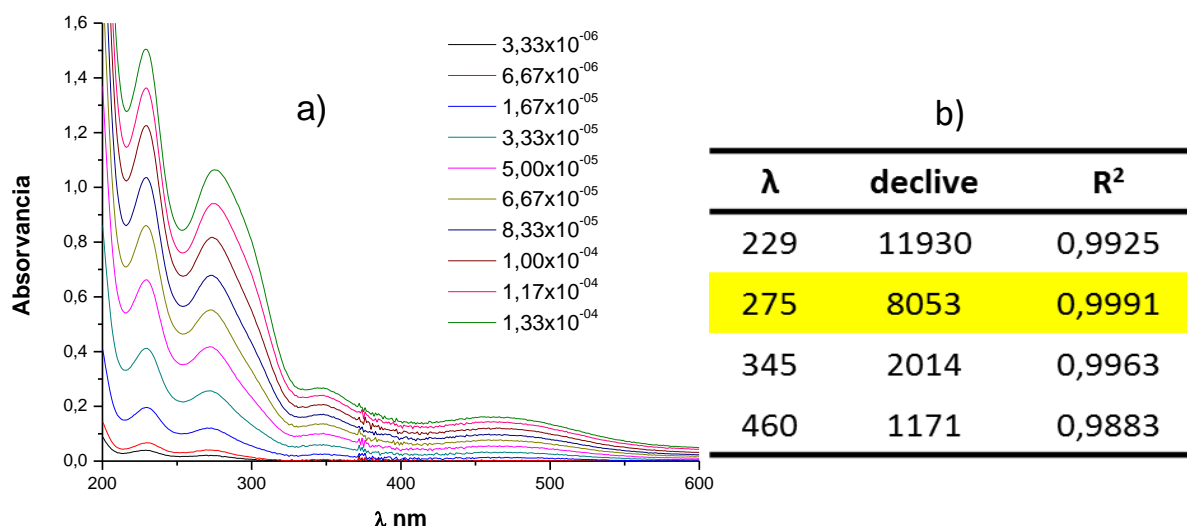


Figura 2.23 – (a) Espectros de absorção do ferroceno carboxaldeído para várias concentrações compreendidas entre 3.33×10^{-6} e 1.33×10^{-4} M, (b) tabela representativa da linearidade entre concentração e absorvância para cada comprimento de onda.

Pela análise da Figura 2.23a e a respetiva tabela (Figura 2.23b) ilustrativa dos declives das diferentes retas para cada comprimento de onda referentes aos picos do espectro do ferroceno carboxaldeído presente na Figura 2.23, determinou-se que o

pico que apresenta melhor linearidade para determinação da concentração de ferroceno carboxaldeído está presente ao comprimento de onda de 275 nm.

Traçou-se o espectro do PAH não funcionalizado de modo a perceber se existiria alguma banda coincidente aos picos do ferroceno carboxaldeído, e verificou-se que o selecionado a 275 nm não tem nenhum pico que possa interferir, Figura 2.24.

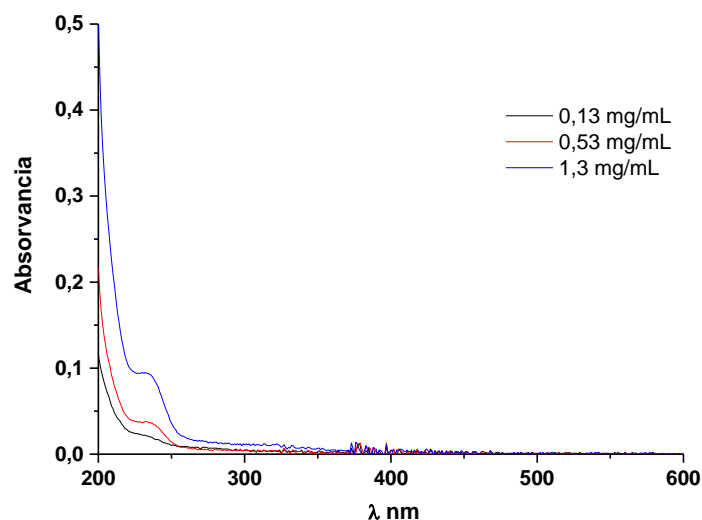


Figura 2.24 – Espectro de absorção do PAH para 3 concentrações distintas entre 200 e 600 nm.

Na Figura 2.25 são apresentados os espectros referentes a cada composto antes da síntese, bem como o espectro do composto resultante.

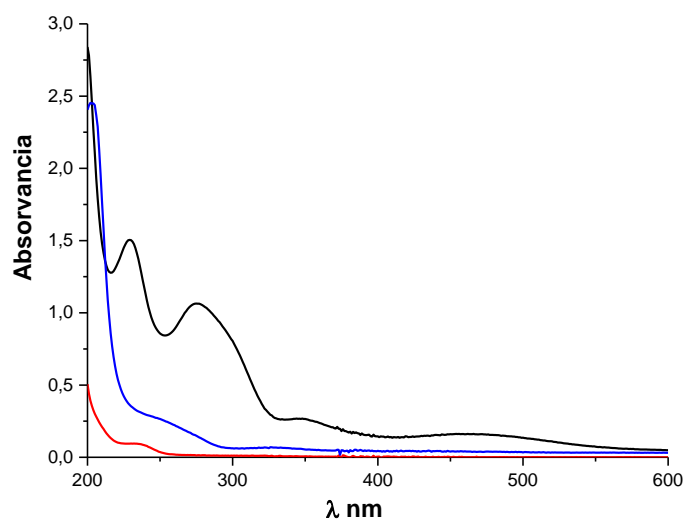


Figura 2.25 – Espectro de absorção de $1,33 \times 10^{-4}$ M ferroceno carboxaldeído (linha a preto), 1,3 mg/mL PAH (linha a vermelho) e solução com o composto sintetizado Fc-PAH (linha a azul).

Da análise do espectro de absorção do Fc-PAH apresentado na figura acima e em comparação com o espectro do composto com ferroceno e do polieletrólito, o mesmo não apresenta os picos característicos do ferroceno carboxaldeído, o que indica que o novo composto tem novas bandas de absorção.

Uma vez que não é apresentado nenhum pico coincidente com os existentes nos reagentes da síntese, não existe possibilidade de garantir o sucesso da síntese através da espectroscopia de UV-VIS.

Convém neste ponto, em face da impossibilidade de quantificar o conteúdo em ferroceno diretamente no polímero sintetizado, de realçar que sempre que nos estudos posteriores se pretende fazer ensaios comparativos, foi utilizado sempre o mesmo lote de material sintetizado. Como tal nos ensaios comparativos o material polimérico utilizado contém sempre a mesma quantidade de ferroceno.

2.4.2.2. Elétrodos de ITO modificados com Fc-PAH

Uma das enormes potencialidades de técnicas eletroquímicas consiste na facilidade com que se detetam espécies eletroativas quer em solução quer imobilizadas numa superfície condutora. Isto é particularmente útil para espécies que apresentem resposta eletroquímica reversível. Para além de permitir a sua deteção, é possível ainda determinar a sua concentração superficial pela quantidade de carga envolvida nos processos de oxidação e redução destas espécies quando imobilizadas [45].

A aplicação de técnicas de varrimento de potencial, tal como a voltametria cíclica, permite ainda, além da identificação e quantificação, inferir se a resposta eletroquímica é proveniente de espécies em solução ou adsorvidas, uma vez que o seu comportamento voltamétrico é bastante distinto.

Para espécies adsorvidas reversíveis obtêm-se picos voltamétricos simétricos e com uma separação entre os potenciais de picos de oxidação e redução muito pequena (próxima de zero milivolts). A inexistência da componente difusiva do transporte de massa, em virtude de já se encontrarem à superfície do elétrodo, traduz-se numa dependência linear da intensidade dos picos observados com a velocidade de varrimento ao qual são obtidos [45].

Em posse deste conhecimento, se forem realizados ensaios com elétrodos de ITO nos quais se depositou uma camada de Fc-PAH, o aparecimento de picos redox atribuídos à oxidação e redução de ferroceno atestará a sua presença como espécie adsorvida assim como o sucesso da síntese orgânica.

Devido ao fato de ITO apresentar uma carga superficial negativa ao potencial de circuito aberto e nas soluções de adsorção do polímero, permite que o mesmo possa ser utilizado sem a necessidade de qualquer modificação prévia, para a imobilização eletrostática de polímeros catiónicos tais como o PAH.

A adsorção electroestática do polímero funcionalizado realizou-se mergulhando o elétrodo de ITO numa solução de tampão acetato pH 5, contendo 1mg / ml de Fc-PAH, durante 15 minutos, seguido de lavagem em água miliQ. A resposta eletroquímica realizou-se em ácido perclórico 0.1 M entre 0 e 0.7 V, tendo sido efetuados vários

ensaios fazendo variar a velocidade de varrimento estando os resultados obtidos apresentados na Figura 2.26.

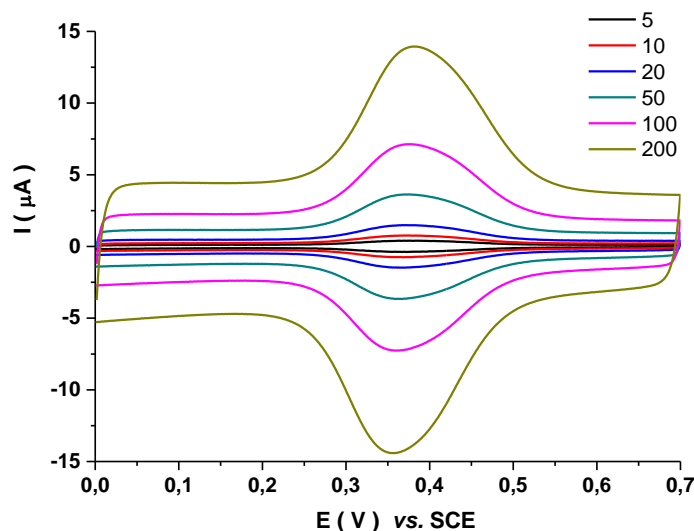


Figura 2.26 – Voltamogramas cíclicos em 0.1 M de HClO_4 de eléctrodo de ITO com Fc-PAH adsorvido à superfície a diferentes velocidades de varrimento entre 5 e 200 mV/s.

Os resultados indicam que o grupo ferroceno está de fato à superfície do eléctrodo, confirmado pelo aparecimento dos picos de oxidação e redução localizados a cerca de 350 mV, verificando-se uma separação entre o pico anódico e o pico catódico de 1.4 mV e uma razão de $I_{\text{pico anódico}}/I_{\text{pico catódico}} = 1$, estes resultados são indicativos da reversibilidade do sistema bem como de uma transferência eletrónica bastante rápida, consistente com a presença de espécies electroactivas adsorvidas à superfície do eléctrodo.

A relação existente entre as correntes de pico (anódico e catódico) e a velocidade de varrimento encontram-se representadas na Figura 2.27.

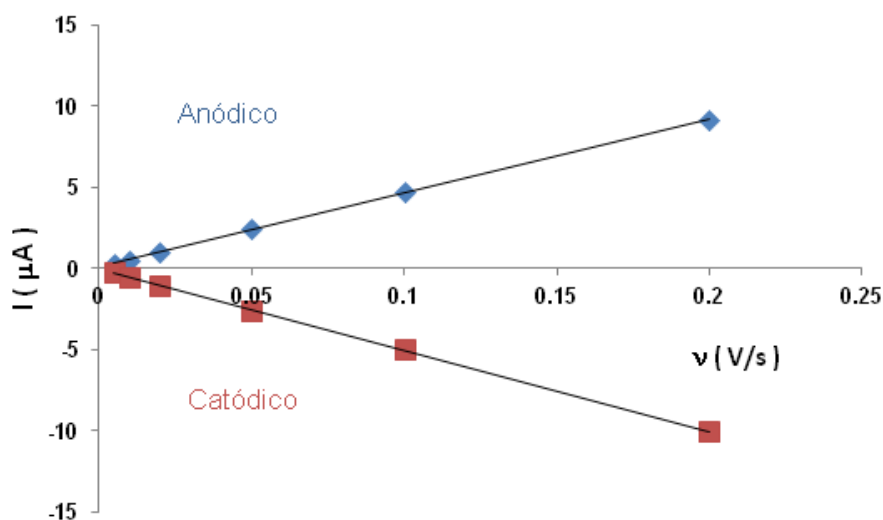


Figura 2.27 – Representação gráfica da corrente de pico em função da velocidade de varrimento.

Verifica-se que existe linearidade entre a corrente de pico e a velocidade de varrimento garantindo assim que o composto está realmente adsorvido à superfície de elétrodo e que a reação é limitada somente pela transferência de carga entre os grupos ferroceno e a superfície de elétrodo.

Pelos resultados obtidos foi possível então confirmar o sucesso da síntese, pelo aparecimento de sinal inerente ao par redox, bem como a sua adsorção ao elétrodo de trabalho de ITO.

De destacar que os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 2.26, correspondem ao décimo ciclo de varrimento a cada velocidade, após a estabilização da resposta eletroquímica. Verificou-se, Figura 2.28, uma grande estabilidade do sinal eletroquímico do elétrodo modificado quando imerso numa solução acídica de HClO_4 0.1M.

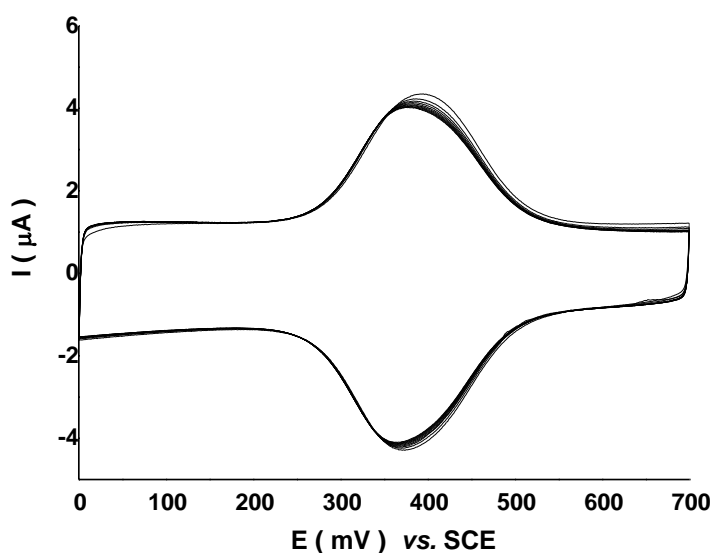


Figura 2.28 – Voltamograma cíclico em 0.1 M de HClO_4 de elétrodo de ITO com Fc-PAH adsorvido à superfície a diferentes velocidades de varrimento entre 50 mV/s, são representados 10 ciclos de varrimento de potencial.

2.4.2.3. Influência do pH na estabilidade do elétrodo de ITO modificado com Fc-PAH

Após garantir o sucesso da síntese e da adsorção do polieletrólito modificado à superfície de elétrodo, efetuou-se o estudo da estabilidade do mesmo a diferentes pH. O procedimento para a adsorção foi realizado nas mesmas condições que os resultados obtidos anteriormente.

A Figura 2.29 representa trinta ciclos de varrimento de potencial entre 0 e 0.7 V em tampão fosfato pH 4 com 0.1M de NaClO_4 , com o objetivo de verificar a estabilidade do sinal eletroquímico apresentado pelo par redox. Os ensaios foram realizados para pH compreendido entre 4 e 9 e compilados sob a forma de gráfico na Figura 2.30.

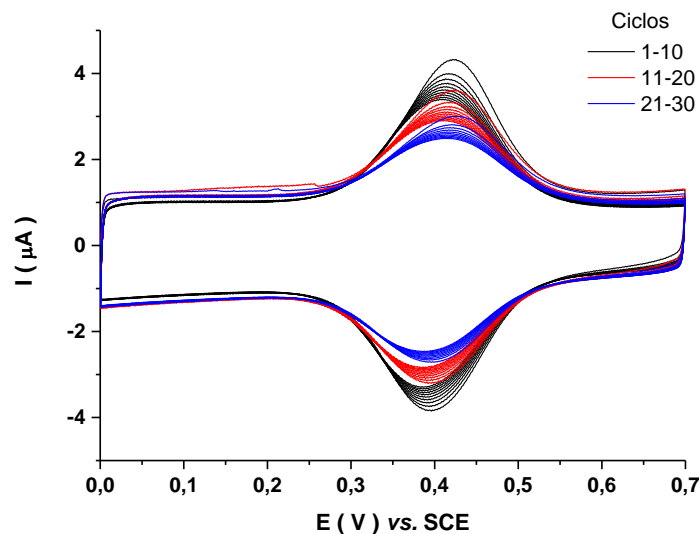


Figura 2.29 – Resposta eletroquímica do elétrodo de ITO modificado com Fc-PAH em tampão pH 4; 30 ciclos a 50 mV/s.

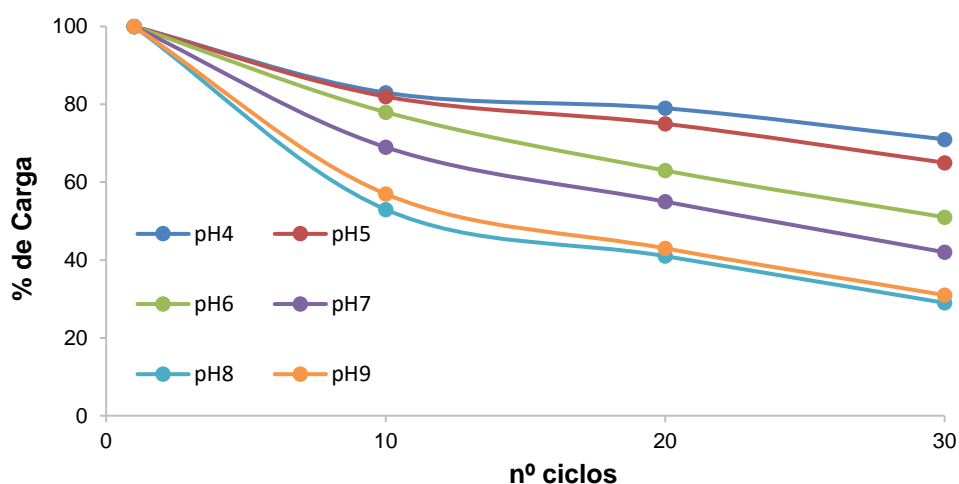


Figura 2.30 – Representação gráfica entre a % de carga em relação ao primeiro ciclo em função do número de ciclos para diferentes pH's entre 4 e 9.

Os resultados indicam que independentemente do pH da solução em que se realizar a caracterização do elétrodo modificado, existe sempre um decréscimo da quantidade de material eletroativo adsorvido, com o varrimento sucessivo de potencial. Este decréscimo por outro lado acentua-se com o aumento do pH da solução.

Esta perda de material ativo poderá ser resultado ou da perda de atividade do grupo ferroceno com o aumento do pH, ou pela desadsorção de material polimérico da superfície de elétrodo devido à neutralização de cargas, em resultado aumento de pH (aproximação ao valor de pKa do polímero, 9.5).

A instabilidade na resposta eletroquímica para filmes finos contendo grupos ferroceno tem também sido reportado na literatura [50]. Por exemplo filmes de Fc-PEI são instáveis quando submetidos a ciclos voltamétricos repetitivos em soluções contendo fosfato a pH 7, apresentando no entanto estabilidade a pH 5 [51]. A corrente de pico associado ao processo redox diminui com o aumento do número de varrimentos. Em contraste a resposta é estável em solução pH 7 com íons perclorato, verificando-se instabilidade somente a pH 11. Tal comportamento foi atribuído à instabilidade dos grupos oxidados do ferroceno que se decompõem na presença de nucleófilos.

Na eventualidade de a responsabilidade do decréscimo de sinal eletroquímico recair sobre a desadsorção de material da superfície, a subsequente modificação por camadas alternadas de polieletrólito catiónico (Fc-PAH) com polieletrólito aniônico (PSS) poderá conferir uma estabilidade adicional ao sistema e a sua aplicação em soluções de pH elevadas, ideais para a ocorrência de EQL.

2.4.2.4. Influência do tipo de eletrólito na estabilidade do eletrodo de ITO modificado com Fc-PAH

A oxidação do Fc-PAH na superfície do eletrodo resulta no aparecimento de cargas positivas na camada polimérica, as quais têm de ser compensadas pela incorporação de contra íons da solução, por forma a preservar a neutralidade. Por outro lado, tal como mencionado anteriormente, é conhecido que os grupos ferroceno no seu estado oxidado, ferricinium (Fc^+), podem sofrer decomposição na presença de nucleofílicos tais como o íão cloreto.

Com base nesta informação, decidiu-se averiguar qual seria o efeito da influência dos aniões presentes no eletrólito na estabilidade do sistema, de modo a verificar a existência de algum anião que previna o decréscimo de carga com o número de ciclos, a pH 7 e em tampão fosfato. Os diferentes aniões utilizados estão enumerados na representação gráfica ilustrada na Figura 2.31, nesta figura somente é apresentado o primeiro ciclo de um conjunto de 20 para cada anião.

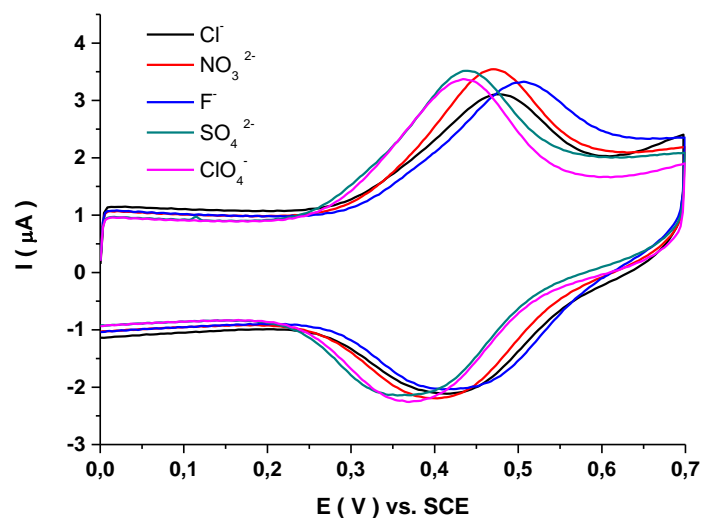


Figura 2.31 – Voltamogramas cíclicos de 0 a 700 mV a 50 mV/s do eletrodo de ITO modificado com Fc-PAH, nos eletrólitos contendo diferentes tipos de anião com concentração de 0.1M em pH 7.

Na Figura 2.32 representa-se graficamente a informação fornecida pelos voltamogramas cíclicos realizados na presença dos diferentes aniões; a informação é apresentada na forma de um gráfico da percentagem de carga do processo anódico em relação ao primeiro ciclo em função do número de ciclos para cada anião presente no eletrólito.

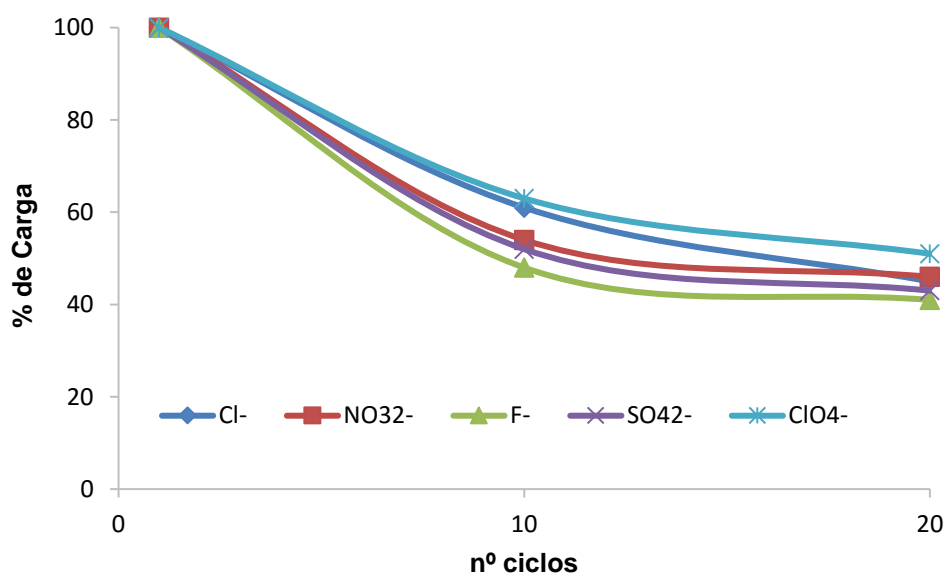


Figura 2.32 – Representação gráfica do decréscimo da % de carga referente ao pico anódico em função do número de ciclos e para cada anião em estudo.

Apesar da natureza distinta dos aniões, em qualquer dos ensaios existiu sempre um decréscimo acentuado da resposta do polímero com o varrimento sucessivo de potencial. Sabendo que por exemplo o anião cloreto é um anião muito mais agressivo

na decomposição dos grupos ferricinium que o ião perclorato, esperava-se uma grande disparidade de resultados entre estes iões.

Estes resultados parecem indicar que a instabilidade observada para estes sistemas não deve estar atribuída à degradação do centro ativo.

2.4.2.5. Estudo da estabilidade de um sistema de multicamadas de polieletrólitos em ITO

Na sequência da discussão anterior avaliou-se a estabilidade dos eletrodos modificados com a introdução sucessiva de várias camadas de polieletrólito modificado com ferroceno (catiônico) e com polieletrólito aniônico.

A adsorção das várias camadas é feita segundo o seguinte esquema representado na Figura 2.33.

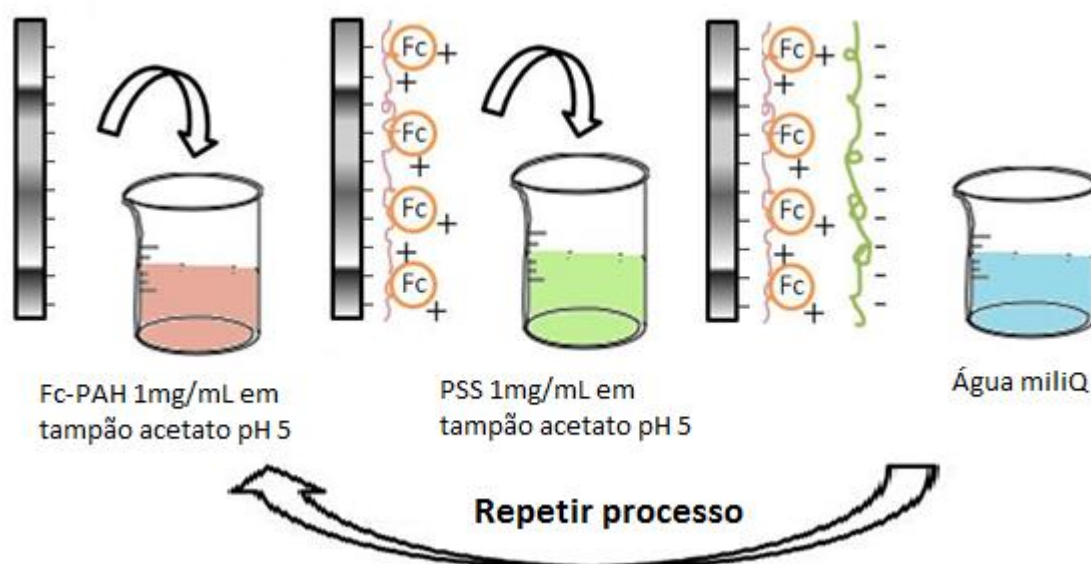


Figura 2.33 – Representação da adsorção de polieletrólitos (catiônico modificado e aniônico) à superfície de eletrodo de ITO.

Na Figura 2.34 são apresentados os voltamogramas cíclicos relativos à resposta no eletrodo de ITO modificado com diferentes camadas de polieletrólito, Figura 2.34a terminado em polieletrólito catiônico e na Figura 2.34b terminado em polieletrólito aniônico, em tampão fosfato pH 7 com 0.1 M de NaClO_4 .

Os ensaios demonstraram que a carga inerente ao processo de oxidação dos grupos ferrocenos aumenta com o número de camadas, tendo um máximo para a sétima camada, quarta camada catiônica. A partir da sétima camada a carga inerente ao processo de oxidação do ferroceno decresce, indicando a existência de um bloqueio ao processo redox nestas condições experimentais.

Estas observações mostram que os grupos ferroceno nas camadas interiores dos filmes são electroquimicamente ativos e aqueles nas camadas externas, inativos, nas condições experimentais testadas; este fenómeno poderá ser devido à existência de menor quantidade de centros ativos e consequente menor taxa de saltos de eletrões (“*electron hopping*”) entre grupos ferroceno adjacentes [52].

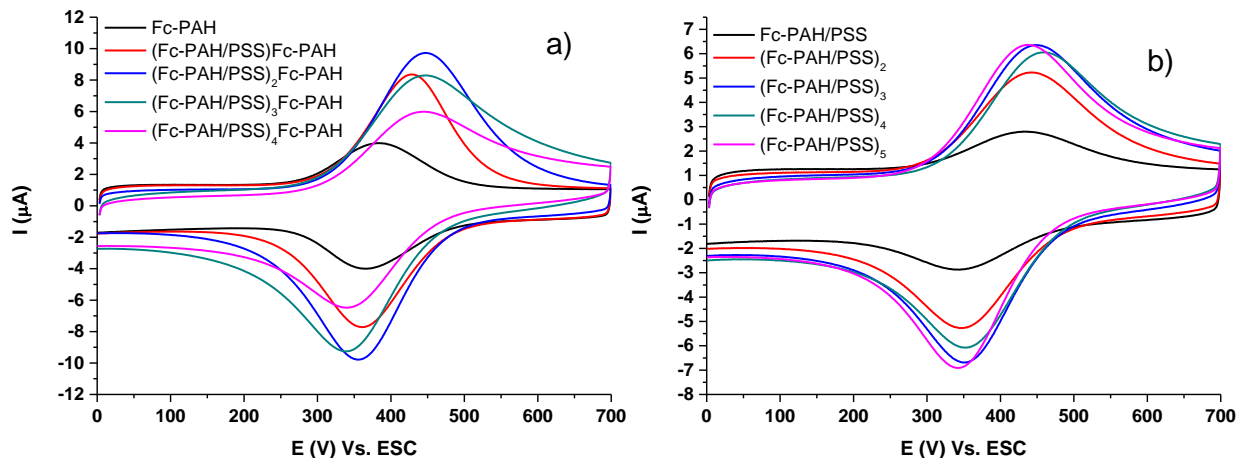


Figura 2.34 – Resposta eletroquímica do elétrodo de ITO modificado: (a) camada terminal com carga positiva e (b) camada terminal com carga negativa, em tampão fosfato pH 7 com 0.1 M de NaClO_4 e $v = 50$ mV/s.

Da Figura 2.34 observa-se também um deslocamento sistemático do potencial de pico para o ferroceno imobilizado para sobrepotenciais superiores e inferiores à medida que o número de camadas aumenta e a camada exterior se alterna entre Fc-PAH para PSS. Este deslocamento é acompanhado pela variação da largura do pico a meia altura dos voltamogramas.

O aparecimento de diferentes posições para o pico de oxidação dos grupos redox sugere que os grupos ferrocenos estão a experienciar diferentes microambientes consoante a introdução de diferentes camadas. A direção e magnitude deste deslocamento de potencial é uma indicação da diminuição ou aumento da estabilização do ião ferricinium por interação eletrostática.

Representou-se na Figura 2.35 as cargas resultantes da integração dos picos anódicos para cada camada em tampão fosfato pH 7, onde é possível verificar um aumento da carga inerente ao processo de oxidação do grupo ferroceno na introdução de cada camada contendo material eletroativo até à sétima camada seguido de um decréscimo de carga para camadas superiores. Este decréscimo deve-se ao afastamento do composto eletroativo da superfície de elétrodo tornando-se difícil proceder à sua oxidação.

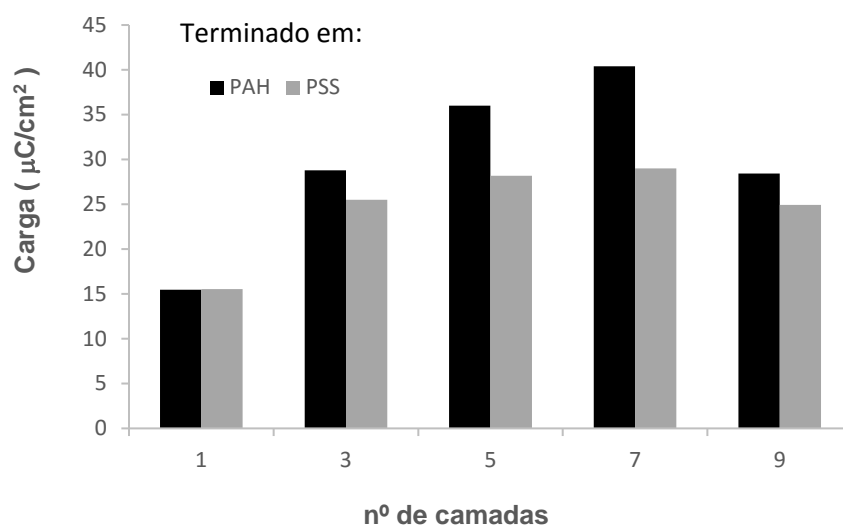


Figura 2.35 – Representação gráfica da carga correspondente ao pico anódico do ferroceno em função do número de camadas de polímero em tampão pH 7.

Efetuuou-se um estudo intensivo do comportamento da superfície de elétrodo modificado a pH 9 desde a primeira camada (Fc-PAH) até à décima segunda camada (Fc-PAH/PSS)₆, tendo em conta os sinais de corrente obtidos em função da velocidade de varrimento, bem como a estabilidade de sinal com o número de ciclos em tampão .

A Figura 2.36 ilustra o ensaio realizado para a primeira camada (Fc-PAH), isto é, apenas com uma camada de Fc-PAH adsorvida à superfície de elétrodo.

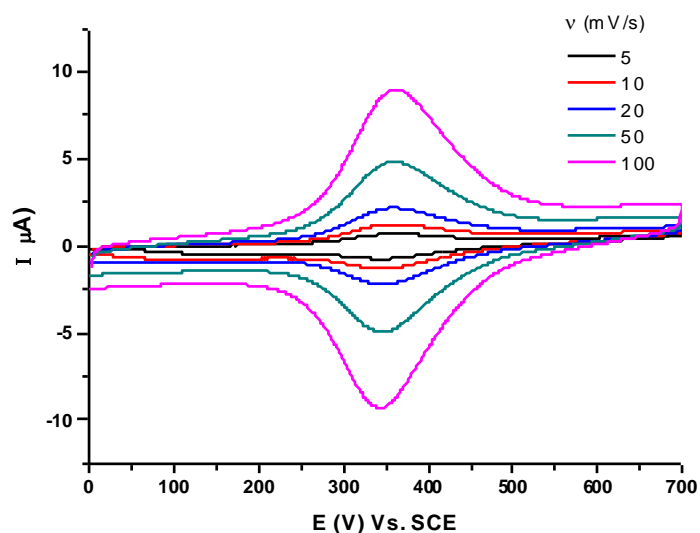


Figura 2.36- Voltamograma cíclico efetuado a diferentes velocidades de varrimento a pH 9 com 0.1M NaClO₄, para superfície de elétrodo de ITO modificada com Fc-PAH.

A dependência de I_{pa} com a velocidade de varrimento ou raiz quadrada da velocidade de varrimento foi averiguada para todos os filmes estudados. A título

ilustrativo apresentam-se na Figura 2.37 apenas as dependências para os elétrodo modificados com Fc-PAH e Fc-PAH/PSS.

Os valores de I_{pa} aumentam de forma linear com a velocidade de varrimento de potencial para a primeira, terceira e quinta camada (terminadas em PAH), indicando a existência de um processo de transferência de carga entre os grupos redox e o elétrodo independente da difusão. Com a introdução sucessiva de camadas externas, os valores de I_{pa} deixam de ser lineares com a velocidade de varrimento, mas passam a variar linearmente com a raiz quadrada da velocidade sendo também a forma dos picos mais alargada. Estes resultados sugerem que para filmes mais espessos uma componente de difusão contribui de forma significativa para o processo de transferência eletrônica.

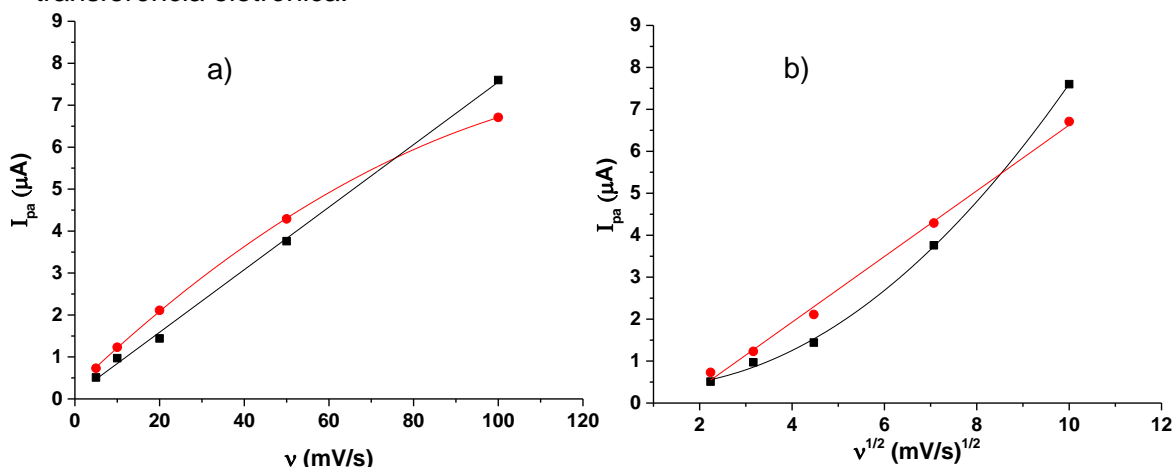


Figura 2.37 – Dependência de I_{pa} com a) a velocidade de varrimento e b) a raiz quadrada da velocidade de varrimento para o electrodo modificado com Fc-PAH (preto) e modificado com Fc-PAH/PSS (vermelho).

Para o estudo em pH 9 (Figura 2.38) o valor de carga máxima é atingido na quinta camada (ITO/(Fc-PAH/PSS)₂/Fc-PAH), enquanto que em pH 7 o mesmo foi atingido somente para a sétima camada. Observa-se também que a pH 9 os valores em absoluto de carga no processo de oxidação são superiores em relação aos apresentados para pH 7.

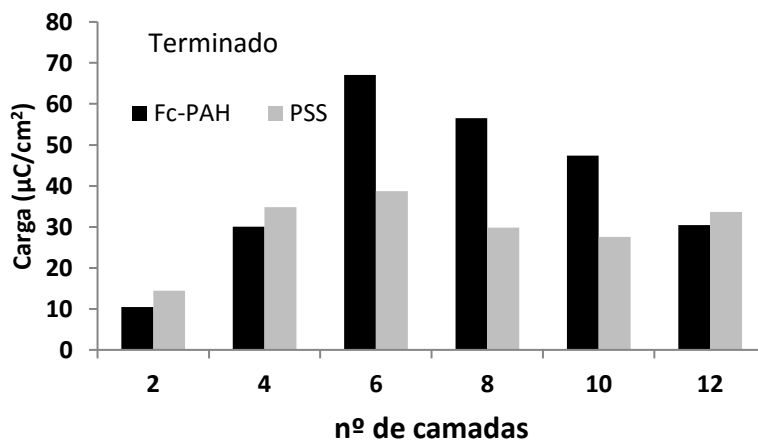


Figura 2.38 - Representação gráfica da carga correspondente ao pico anódico do ferroceno em função do número de camadas de polímero em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.

Estudou-se a perda de carga em função do número de ciclos realizados em tampão carbonato/bicarbonato com 0.1 M de NaClO_4 , pela análise da seguinte tabela existe perda considerável na resposta eletroquímica do grupo ferroceno no processo de oxidação em função do número de ciclos realizados a pH 9.

Tabela 2.3 – Resultados obtidos da percentagem da carga devida à oxidação do ferroceno em função do número de ciclos em tampão carbonato/bicarbonato com 0.1M de NaClO_4 pH 9.

Ciclo nº	Camada nº											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
25	11%	24%	55%	28%	31%	14%	24%	22%	36%	34%	26%	27%
50	1%	13%	27%	13%	19%	6%	11%	11%	17%	16%	13%	15%

Neste ensaio efetuaram-se 50 ciclos de varrimento de potencial de 0 a 0.7 V a 50 mV/s em tampão carbonato/bicarbonato com 0.1 M de NaClO_4 pH 9, com o intuito de verificar a possibilidade de obter uma combinação (nº de camadas) que favorecesse a estabilidade do sinal do ferroceno.

Mais uma vez as dúvidas continuam em relação à falta de estabilidade, será que o polieletrólito carregado positivamente a pH mais elevados passa a carga parcial neutra, diminuindo a força das ligações eletrostática e consequentemente promove a desadsorção da superfície de eletrodo, ou poderá ser devido à perda de sinal do grupo ferroceno.

Devido à falta de estabilidade demonstrada na superfície de ITO, estes eletrodos modificados não seriam eficazmente aplicados, nesta fase, na plataforma da Lumisense, optando-se assim por estudar a construção de camada por camada na superfície de eletrodo de ouro modificada com uma SAM aniônica.

2.4.2.6. Eletrodo de Au modificado com monocamadas de alcanotióis

Tal como discutido na introdução deste capítulo, alguns autores reportam a possibilidade de modificar eletrodos com monocamadas contendo grupos ionizáveis, de modo a fazerem uso da repulsão electrostática das cargas negativas presentes na superfície do eletrodo com o anião luminol presente em solução (Figura 2.3).

Estendendo este mesmo raciocínio ao nosso sistema, foi testado se a presença de uma monocamada (contendo grupos sulfônicos) na superfície do ouro, poderá servir para imobilizar o polieletrólito catiónico contendo grupos pendentes de ferroceno e simultaneamente inibir a electrooxidação do luminol. Na figura seguinte encontra-se ilustrado a estrutura química do composto testado para avaliar esta hipótese, 3-mercaptopropanosulfonato de sódio.

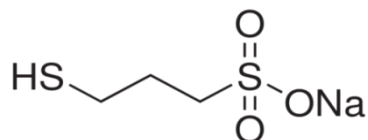


Figura 2.39 - Estrutura química do 3-mercaptopropanosulfonato de sódio (MPS).

Para os estudos iniciais de adsorção química e desadsorção eletroquímica das monocamadas de MPS, foi decidido usar como material de eletrodo, placas de ouro com orientação preferencial monocristalina. Isto porque favorecem uma adsorção muito ordenada e compacta de derivados de enxofre em ouro, susceptíveis de serem quantitativamente desadsorvidos, como descrito em baixo.

A formação de monocamadas puras deste composto foi efetuada por imersão do eletrodo de ouro, numa solução com 20 mM do composto, em H_2SO_4 10 mM e com diferentes tempos de imersão (de 10 a 960 minutos). Após a modificação, os mesmos são lavados abundantemente com água milli-Q por forma a remover possíveis moléculas não ligadas fortemente à superfície do eletrodo.

No estudo de desadsorção de MPS em 0.5M NaOH, a solução foi desarejada durante 1 hora com azoto de modo a retirar o oxigénio presente em solução, para que o processo de redução do mesmo não interferisse com a resposta de desadsorção da monocamada. Na Figura 2.40, apresentam-se os voltamogramas referentes aos processos de desadsorção redutiva de superfícies de ouro modificadas com diferentes tempos de imobilização de MPS.

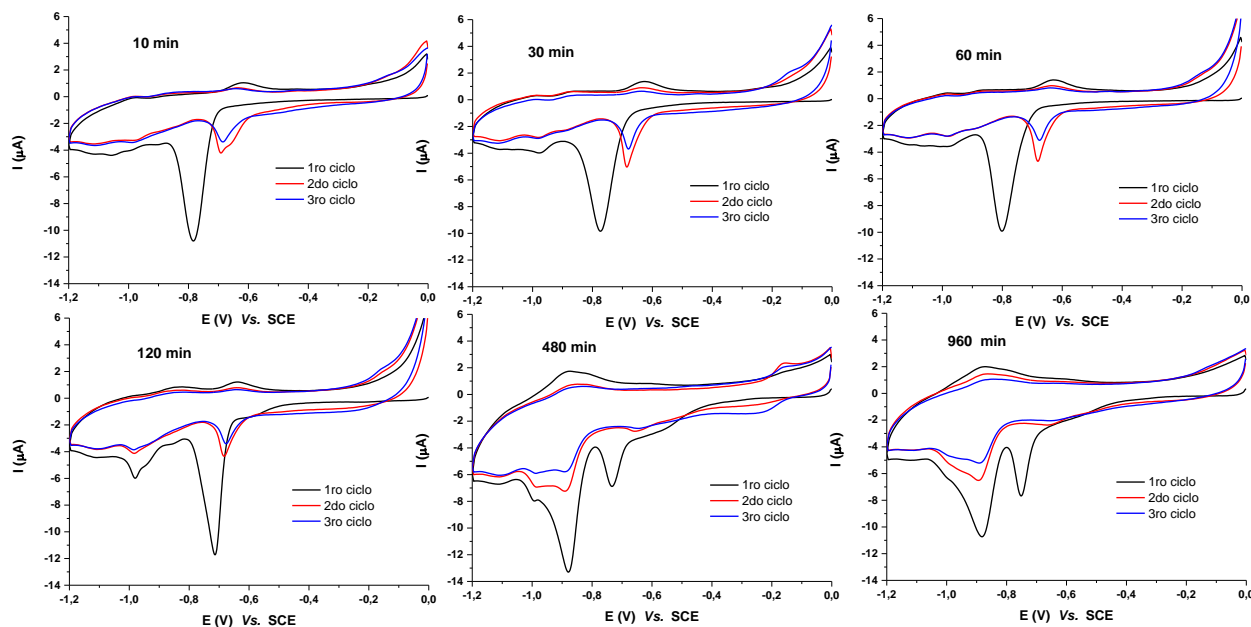
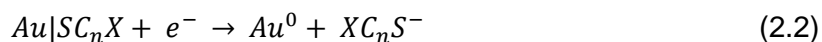


Figura 2.40 - Voltamogramas cíclicos efetuados em 0.5 M NaOH de -1.2 a 0 V, para diferentes tempos de adsorção de MPS, $\nu = 20$ mV/s.

É globalmente aceite na comunidade científica que a desadsorção redutiva, em meio básico, de monocamadas automontadas tendo como grupos âncora tióis, ligados a superfícies de ouro, é caracterizada com o aparecimento de um pico bem definido a potenciais negativos [53] [54]. O potencial ao qual este processo ocorre e a forma do

pico, são reveladores da maior ou menor estabilidade da modificação, e a sua magnitude (carga envolvida) diretamente relacionada com quantidade de material depositado [53]. É geralmente aceite que a reação que descreve a desadsorção é:



Analisando em maior detalhe por exemplo, o voltamograma, para o comportamento da monocamada depositada com 10 minutos, verifica-se que o primeiro ciclo de varrimento catódico é caracterizado por uma resposta puramente capacitiva entre 0 e -0.6 V. De notar que esta corrente é substancialmente inferior na superfície Au-MPS que no elétrodo após remoção da monocamada. A potenciais mais negativos regista-se o aparecimento de um pico bem definido a cerca $E_{pc} = -0.8$ V vs. SCE, atribuído ao processo de desadsorção da monocamada, e uma segunda banda catódica mal definida para valores de potenciais inferiores -0.95 V, consistente com a desadsorção de átomos de enxofre de outras orientações cristalinas da superfície de ouro, por exemplo (110), que estabelecem ligações mais energéticas [54]. No varrimento inverso ocorre a existência de um pico anódico a cerca de -0.65 V, bem documentado na literatura como processos de re-adsorção de uma pequena quantidade de tióis previamente desadsorvidos [53] [55]. Nos varrimentos subsequentes verifica-se a ausência do pico anteriormente localizado a -0.8 V e o aparecimento de um novo pico, ~-0.7 V correspondente à remoção dos tióis re-adsorvidos no processo anódico.

Da observação da Figura 2.40, verificou-se ainda, que para tempos de imersão superiores a 480 min existem dois processos de desadsorção com relevância, um mais intenso centrado a ca. de -0.9 V e outro menos negativo a cerca de -0.75 V. Este comportamento, que é típico em monocamadas preparadas propositadamente com dois alcanotióis de diferentes comprimentos e/ou grupos funcionais, reflecte a coexistência de domínios com organização e empacotamento molecular diferentes para tempos de adsorção de MPS longos. Claramente, o ambiente dos átomos de enxofre altera-se durante a deposição o que pode indicar uma forte interação dos grupos ionizáveis, ou a formação de multicamadas, através por exemplo, de interações entre os grupos terminais carregados e grupos tiol livres em solução, ou ainda a algum tipo de degradação química dos grupos terminais, que possam levar a uma estabilização acrescida da maioria dos átomos de enxofre dasorvidos no ouro.

Com base nos valores de carga envolvida no processo de desaduração (mC), a cobertura superficial (mol/cm^2) pode ser determinada através da seguinte relação [56]:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (2.3)$$

Onde Q é a carga envolvida nos processos farádicos; n , é o número de eletrões envolvidos (neste caso $n=1$); F , é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}) e A , a área geométrica do electrodo (cm^2).

Os valores relativos às cargas envolvidas no processo de desadsorção e respetivas coberturas superficiais de monocamadas formadas com diferentes tempos de preparação encontram-se compilados na Tabela 2.4. Contudo o recobrimento da superfície apresenta valores bastante semelhantes, o que leva a crer que a existência do segundo pico de desadsorção para tempos elevados de imobilização deve ser

proveniente de uma possível reação paralela do MPS imobilizado com a solução de imobilização.

Tabela 2.4 – Valores de carga em função da área e recobrimento de superfície relativos ao estudo de tempo de imobilização de MPS representado na Figura 2.40.

Tempo (min)	Q/A (C/cm ²)	Γ (mol/cm ²)
10	7.46 x 10 ⁻⁵	7.74 x 10 ⁻¹⁰
30	7.94 x 10 ⁻⁵	8.23 x 10 ⁻¹⁰
60	7.33 x 10 ⁻⁵	7.60 x 10 ⁻¹⁰
120	8.92 x 10 ⁻⁵	9.24 x 10 ⁻¹⁰
480	9.15 x 10 ⁻⁵	9.48 x 10 ⁻¹⁰
960	7.45 x 10 ⁻⁵	7.72 x 10 ⁻¹⁰

Os valores de cobertura superficiais estão compreendidos entre 7.74 x 10⁻¹⁰ a 9.48 x 10⁻¹⁰ mol cm⁻² revelando que não existe uma grande dependência da quantidade de material depositado com o tempo de deposição, para tempos superiores a 10 minutos de imersão. Estes valores, estão em concordância com o reportado na literatura para monocamadas de alcanotóis, com um empacotamento denso, 7.76 x 10⁻¹⁰ mol cm⁻², que corresponde a uma área molecular de 21.4 Å² [57].

Pela observação dos resultados presentes na Tabela 2.4, escolheu-se o tempo de imobilização de 10 minutos, uma vez que os valores de recobrimento não diferem muito com o tempo de adsorção, e para as experiências com tempos de imersão iguais ou superiores a 480 minutos poderá ter ocorrido alguma alteração na organização ou na natureza química da monocamada.

Uma vez que o desenho das células eletroquímica para a aquisição de sinal ótico e medidas eletroquímicas, no caso do eletrodo de ouro, foi inicialmente construída contemplando a utilização do eletrodo de ouro policristalino, existiu a necessidade de efetuar um estudo idêntico ao anterior, no ouro policristalino.

Para o ouro policristalino selecionou-se como tempo de adsorção: 10 e 900 minutos, avaliando-se ainda a reprodutibilidade do sistema efetuando três ensaios nas mesmas condições.

Os voltamogramas cíclicos típicos relativos ao comportamento deste eletrodo modificado em meio básico encontram-se apresentados na figura seguinte (Figura 2.41).

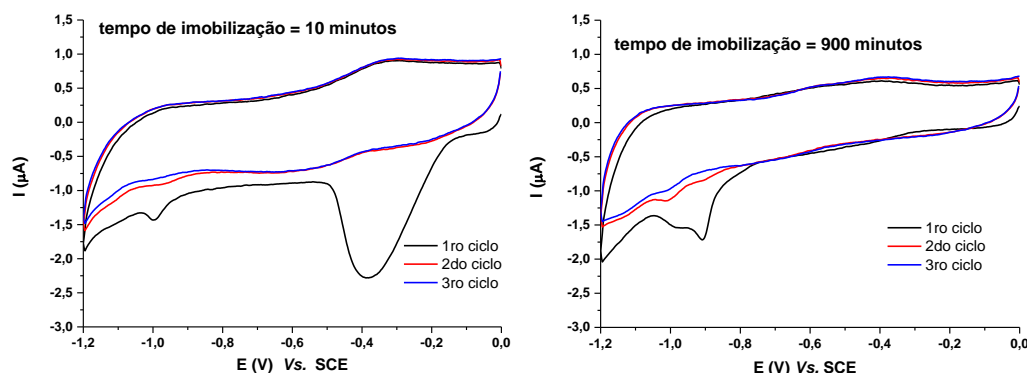


Figura 2.41 - Voltamogramas cíclicos efetuados em 0.5M NaOH de -1.2 a 0 V, para diferentes tempos de adsorção de MPS no elétrodo de Au policristalino, $v = 20$ mV/s.

Uma das primeiras observações da análise dos resultados obtidos na superfície de ouro policristalina, Figura 2.41, consiste na notória diferença na forma, intensidade e posição dos picos de desadsorção da monocamada, comparativamente aos resultados ilustrados na Figura 2.40. Esta diferença demonstra a forte dependência da organização de monocamadas com a natureza da superfície do elétrodo.

No caso do ouro policristalino para 10 min de adsorção da SAM, o pico muito largo localizado a cerca -0.4 V deverá ser oriundo da redução de óxidos presentes na superfície do elétrodo. A intensidade e posição deste pico é bastante dependente de ensaio para ensaio, e mesmo para experiências realizadas nas mesmas condições experimentais. Os picos associados ao processo redutivo das monocamadas encontram-se assinalados na figura anterior e localizados a potenciais perto de -1 V. Com base na carga envolvida no processo da sua redução, tal como anteriormente, a cobertura superficial foi determinada, estando os resultados compilado na tabela seguinte.

Tabela 2.5 - Valores de carga por área e recobrimento relativos ao estudo de tempo de imobilização de MPS no elétrodo de Au policristalino referente à Figura 2.41.

Imobilização (min)	Q/A (C/cm ²)	Γ (mol/cm ²)
10 min	2.35×10^{-5}	2.44×10^{-10}
900 min	8.82×10^{-5}	9.14×10^{-10}

Para esta superfície de elétrodo existe uma diferença significativa no valor de recobrimento obtido para tempos de deposição de 10 e 900 minutos. No caso dos 10 minutos e de acordo com o valor teórico aproximado para uma cobertura total, não considerando a rugosidade do elétrodo, obtém-se apenas 31.4% de recobrimento da superfície.

A utilização de elétrodos modificados com MPS tem por intuito conferir cargas negativas à superfície do mesmo por forma a inibir a oxidação direta do luminol (na sua forma aniónica) e simultaneamente conferir uma densidade eletrónica ideal para a interação electrostática com possíveis polieletrólitos catiónicos. Para conferir se de

facto um eléctrodo modificado, com apenas 10 minutos de adsorção, apresenta esta capacidade, avaliou-se o seu comportamento em soluções contendo um par redox, catecol, assim como à presença de luminol, Figura 2.42.

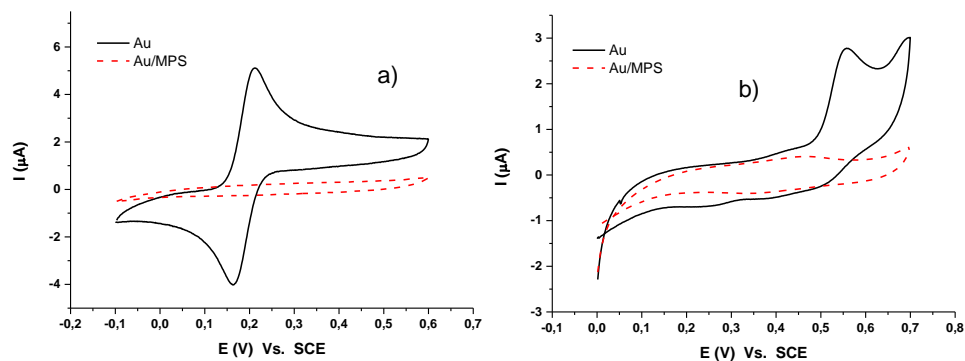


Figura 2.42 – Resposta eletroquímica de (a) catecol e (b) luminol em tampão fosfato pH 6.5, em eléctrodo de Au (preto) e Au/MPS (tracejado vermelho), $v = 20$ mV/s.

Da análise dos voltamogramas registados é interessante verificar que a resposta eletroquímica redox do catecol é fortemente inibida sugerindo um bloqueio eficaz da monocamada apesar da sua baixa cobertura superficial. O mesmo resultado foi obtido para a presença do luminol em solução verificando-se a inexistência do pico de oxidação deste, a potenciais cerca de 0.7 V, na superfície Au-MPS.

Perante estes resultados a obtenção de uma superfície de Au-MPS, nas condições seleccionadas, parece ser promissora para uma futura inibição da oxidação direta do luminol no eléctrodo e promover a interação eletrostática de polieletrólitos catiónicos.

Um dos parâmetros essenciais a determinar, quando se pretende usar eléctrodos modificados, consiste em aferir qual a janela de potencial operacional. Uma vez que o potencial de trabalho utilizado é positivo torna-se necessário conhecer e estabelecer o limite de potencial anódico, a partir dos quais ocorre a destruição da modificação previamente efetuada. No caso de monocamadas de tióis esses limites são impostos pelo potencial ao qual irá ocorrer a desadsorção oxidativa, para tal o comportamento do eléctrodo modificado foi avaliado em meio ácido e neutro, Figura 2.43.

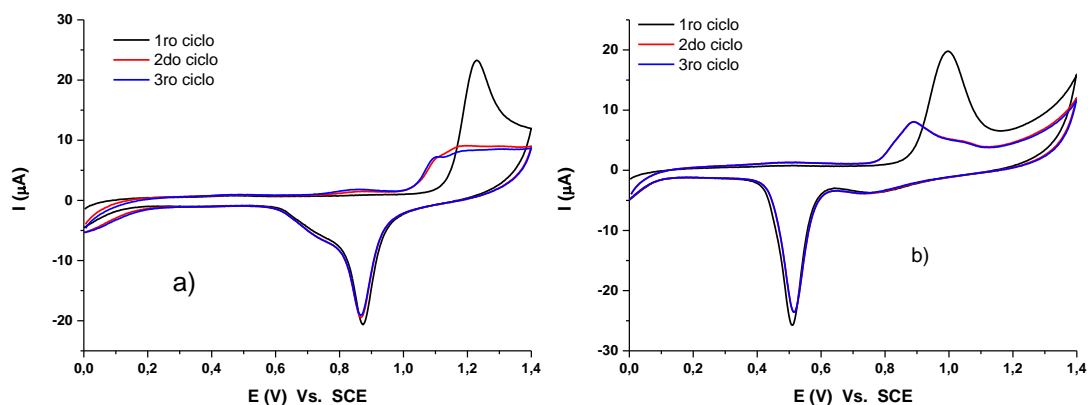


Figura 2.43 – Voltamograma cíclico para avaliar o processo de oxidação em 0.1M de HClO_4 (a) e em tampão fosfato com 0.1M NaCl (pH 6.5) (b) para um eléctrodo de ouro policristalino modificado uma monocamada de MPS com 10 mn de adsorção, $v = 20$ mV/s.

Pela observação da Figura 2.43a verifica-se que o limite anódico de trabalho em meio ácido está situado por volta dos 1.0 V e em PBS pH 6.5 nos 0.85 V (Figura 2.43b), significando que quanto maior o pH de trabalho mais o potencial de formação de óxidos se desloca para valores menos positivos.

2.4.2.7. Estudo da formação de multicamadas de polietrólitos na superfície Au-MPS

Após modificação do elétrodo com MPS, de acordo com o procedimento anteriormente discutido, o mesmo foi imerso em solução de Fc-PAH de 8mg/mL em tampão acetato pH 5, durante 1 hora, e lavado com água miliQ após imobilização, como se comprova pela visualização da Figura 2.44, observa-se a resposta eletroquímica do par redox.

A Figura 2.44 apresenta a comparação entre os voltamogramas cíclicos de um elétrodo de ouro limpo, de Au-MPS e de Au-MPS/Fc-PAH em tampão acetato pH 5. O elétrodo modificado apenas com a monocamada apresenta apenas uma corrente capacitiva no intervalo de potencial estudado. Após a adsorção do polímero redox, verifica-se o aparecimento da resposta eletroquímica típica para um par redox reversível, Fc^+/Fc , traduzida pelo aparecimento de um par de picos anódico e catódico bem definidos e separados apenas por 30 mV, atestando a sua adsorção à superfície de elétrodo.

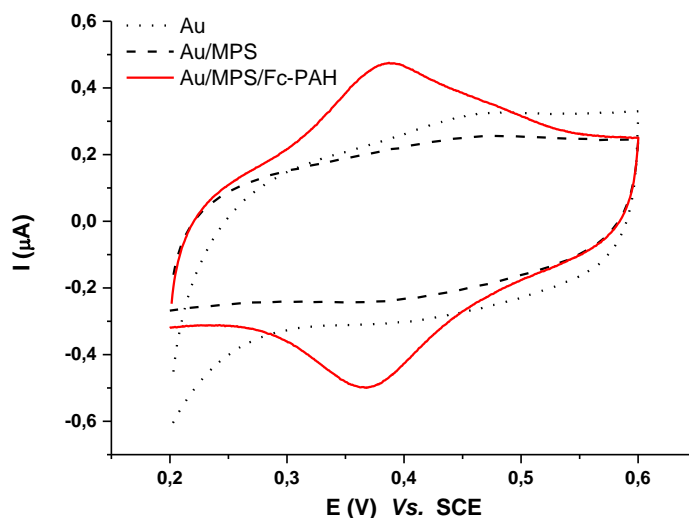


Figura 2.44 – Voltametria cíclica em 0.1M HClO_4 ao longo da modificação de um elétrodo de ouro policristalino com uma SAM de MPS e polieletrólito catiónico (Fc-PAH). $\nu = 20 \text{ mVs}^{-1}$.

A resposta eletroquímica observada para os grupos ferroceno presentes no polieletrólito, demonstra, tal como num estudo anterior reportado na literatura [39], que uma cadeia curta de alcanotióis é adequada o suficiente para permitir a aproximação

dos centros metálicos no PAH do ouro, de modo a que a transferência de carga ocorra a uma velocidade apreciável.

Tal como anteriormente para o eléctrodo de ITO, também para a superfície de Au-MPS foi estudada a resposta eletroquímica, para superfícies com camadas alternadas de polieletrólito catiónico e aniónico, Au-MPS/(Fc-PAH/PSS)_n.

Para cada camada de polieletrólito introduzida, estudou-se a resposta eletroquímica da mesma por a técnica de voltametria cíclica fazendo-se variar a velocidade de varrimento. Este estudo permite, tal como anteriormente, discutir os mecanismos de transporte de carga envolvidos nos diferentes filmes.

Na Figura 2.45 apresentam-se, a título representativo, os resultados obtidos para um eléctrodo modificado com três camadas: Au-MPS/(Fc-PAH/PSS)Fc-PAH.

Observa-se que a corrente dos picos redox aumenta linearmente com o aumento da velocidade de varrimento, sendo este o comportamento esperado para espécies adsorvidas e eletroquimicamente ativas, na superfície do eléctrodo,

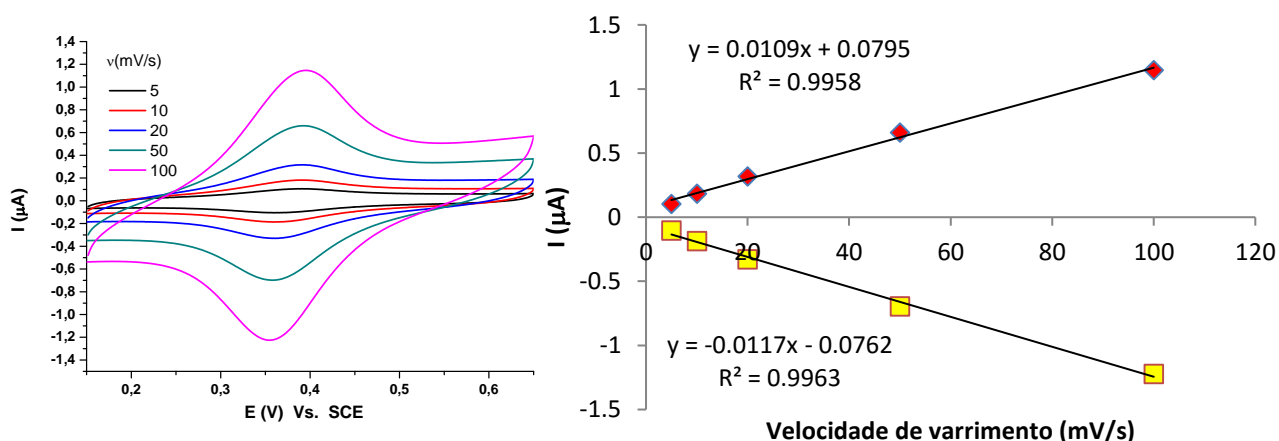


Figura 2.45 – Resposta eletroquímica em tampão acetato pH 5 de eléctrodo modificado, Au/MPS(Fc-PAH/PSS)Fc-PAH em função da velocidade de varrimento, e a respetiva representação gráfica dos valores obtidos para o pico anódico e catódico em função da velocidade

Tal como observado para o electrodo de ITO, verifica-se que existe linearidade de I_{pico} anódico e catódico com a velocidade de varrimento para a primeira, terceira e quinta camada (terminadas em PAH), indicando a existência de um processo de transferência de carga entre os grupos redox e o eléctrodo independente da difusão. As restantes camadas demonstram linearidade com a raiz da velocidade de varrimento sugerindo que para filmes mais espessos há uma componente difusional que contribui de forma significativa para o processo de transferência eletrónica.

O estudo da carga envolvida no processo de oxidação do ferroceno ao longo da construção do sistema camada por camada é apresentado na seguinte figura, os ensaios foram todos realizados em tampão acetato pH 5 com 0.1M de NaClO₄.

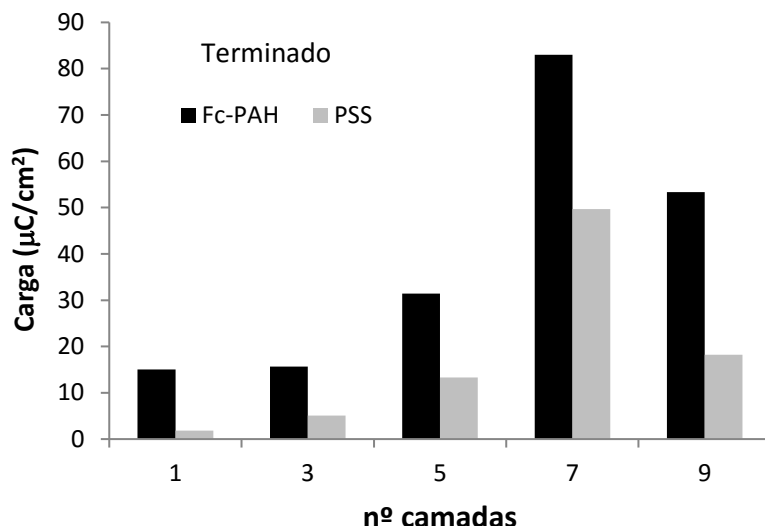


Figura 2.46 - Representação gráfica da carga correspondente ao pico anódico do ferroceno em função do número de camadas de polímero em tampão acetato pH 5.

Este ensaio apresentou resultados análogos aos obtidos em ITO a pH 7, apresentado na Figura 2.35, estando o limite de carga associado à sétima camada de polieletrólito, ou à quarta camada carregada positivamente.

2.4.2.8. Estudo da oxidação do luminol no elétrodo modificado, Au-MPS

Estudou-se o efeito da modificação anterior do elétrodo no processo de oxidação do luminol utilizando a técnica de voltametria cíclica para obter a resposta inerente a cada modificação de elétrodo. Neste caso efetuou-se um ciclo de varrimento de potencial entre 0 e 0.6 V numa solução contendo 0.5 mM de luminol em tampão carbonato/bicarbonato pH 9 com 0.1M de NaClO₄.

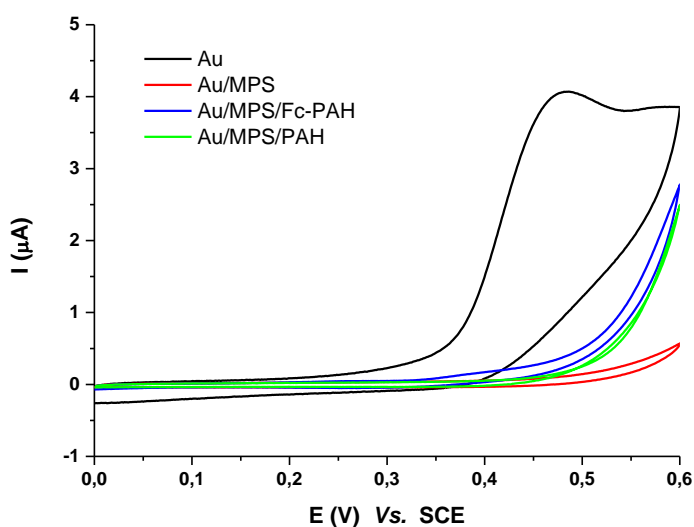


Figura 2.47 – Resposta eletroquímica de elétrodo de Au, modificado com MPS e FC-PAH ou PAH, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9 com 0.1 M de NaClO₄. $\nu = 20$ mV/s.

Tal como o observado anteriormente em soluções de pH 6.5, Figura 2.42, também para soluções com pH superior (pH 9), se verifica um bloqueio eficaz do processo de oxidação do luminol, quando na presença de um eletrodo modificado com uma monocamada de MPS. O pico de corrente anódico observado a cerca de 450 mV, no eletrodo de ouro limpo e atribuído à oxidação do luminol em solução, é totalmente suprimido pela presença desta monocamada.

Com a introdução adicional de polieletrólitos, com ou sem ferroceno na sua estrutura, visualiza-se um pequeno aumento dos valores de correntes para valores de potenciais superiores a 0.6 V, sem se visualizar no entanto o pico característico da oxidação do luminol, ou podendo este estar descolado para valores de potencial muito superiores, fora do intervalo de trabalho ideal.

Apresenta-se na Figura 2.48 uma ampliação para a resposta eletroquímica do eletrodo modificado com polieletrólito numa solução contendo luminol, retirado da figura 49, e acrescenta-se a resposta eletroquímica do eletrodo modificado com Fc-PAH na ausência de luminol.

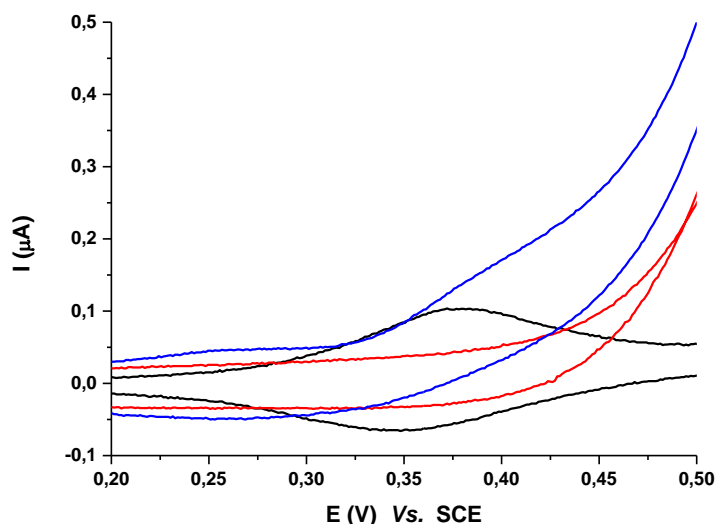


Figura 2.48 – Resposta eletroquímica do eletrodo modificado com polieletrólito contendo ferroceno numa solução contendo luminol (azul) e na ausência do mesmo (preto). A vermelho está representado a resposta eletroquímica de um eletrodo modificado com polímero sem ferroceno na presença de solução com luminol, $\nu = 20$ mV/s.

Uma análise detalhada permite verificar a resposta do par redox na ausência de luminol (linha a preto). No caso do eletrodo modificado sem o grupo ferroceno o potencial de oxidação do luminol acontece a valores mais positivos de potencial em comparação com o potencial em que o ferroceno é oxidado, contudo no eletrodo modificado com ferroceno, verifica-se que a oxidação do luminol acontece exatamente ao mesmo potencial em que o ferroceno oxida, permitindo assim afirmar que o ferroceno presente no polímero serve de mediador na oxidação do luminol.

O mesmo estudo foi efetuado mas desta vez na presença de 0.5 mM de H_2O_2 e com aquisição de sinal ótico.

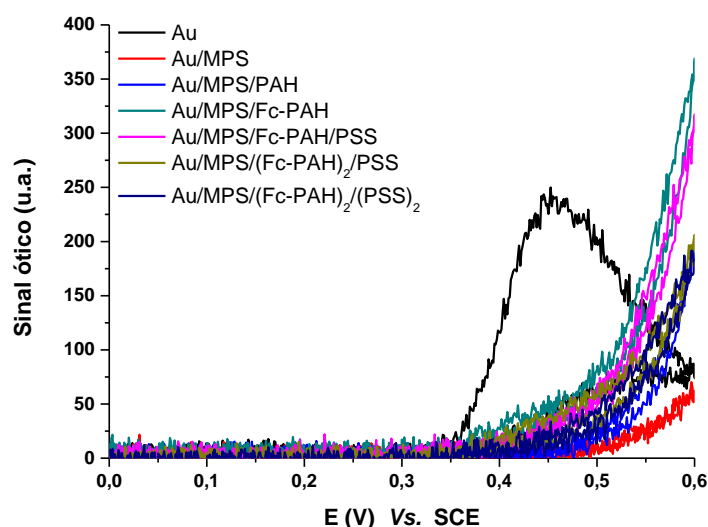


Figura 2.49 – EQL proveniente da resposta eletroquímica de eletrodo de ouro limpo e modificado com monocamada e polieletrólito como descrito na legenda, contendo 0.5 mM de cada constituinte no sistema luminol/H₂O₂ em carbonato/bicarbonato pH 9 com 0.1M de NaClO₄. $\nu = 20$ mV/s.

Os resultados provenientes da aquisição de EQL corroboram o descrito anteriormente na observação das correntes inerentes ao processo no eletrodo modificado. Na presença do eletrodo modificado com monocamada de MPS a oxidação do luminol inicia-se somente para potenciais mais positivos, bloqueando totalmente a oxidação do luminol no intervalo escolhido em função da estabilidade da monocamada. Por outro lado, introduzindo Fc-PAH o aparecimento de luz dá-se ao mesmo potencial que a oxidação do ferroceno.

A Figura 2.49 permite também verificar que o sinal de EQL diminui com o aumento de camadas de polímero, independentemente da camada terminal do mesmo. Este fenômeno pode dever-se aos processos de transferência de carga inerentes a estes polímeros, discutidos anteriormente, nomeadamente pela introdução de uma componente de difusão no processo de conversão redox. É admissível também conjecturar uma maior dificuldade de acesso do anião do luminol aos grupos redox internos do polímero imposto por uma repulsão eletrostática dos grupos aniônicos do PSS não neutralizados pela interação com o polímero catiónico,

Por forma a verificar a dependência do sinal de EQL obtido com o método de perturbação eletroquímico imposto, na figura seguinte apresentam-se os resultados obtidos por voltametria cíclica em contraste com os registados por aplicação sucessiva de pulsos de potencial, para o eletrodo de ouro não modificado e modificado.

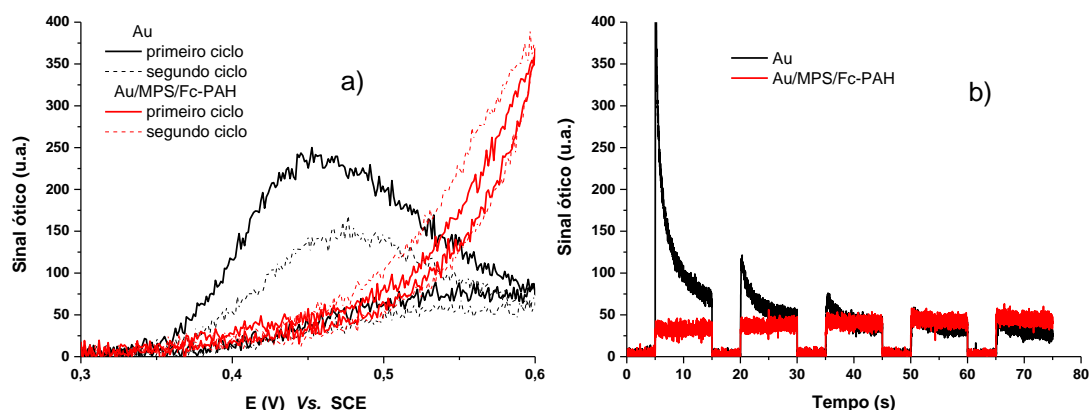


Figura 2.50 – EQL proveniente da resposta eletroquímica de em elétrodo limpo (preto) e modificado com MPS/Fc-PAH (vermelho), (a) voltametria cíclica e (b) aplicação de pulsos de potencial numa solução contendo 0.5mM de Luminol/ H_2O_2 em tampão carbonato/bicarbonato pH9.

A observação da Figura 2.50a e Figura 2.50b permite-nos afirmar que o sinal de EQL proveniente do elétrodo não modificado diminui drasticamente com o número de ciclos de varrimento de potencial ou com a aplicação de pulsos de potencial, enquanto que para o elétrodo modificado o sinal de EQL mostra-se mais estável.

Estes resultados parecem indicar que esta aproximação ao problema é promissora face aos objetivos traçados.

2.5 Conclusões

Foi possível demonstrar que elétrodos recobertos com uma camada polimérica depositada pela metodologia de camada por camada, incluindo polieletrólitos aniônicos funcionalizados com ferroceno na sua estrutura, medeiam a reação de electroquimioluminescência da reação de luminol com peróxido de hidrogénio.

O trabalho iniciou-se com o estudo do comportamento eletroquímico e respetiva resposta de EQL de diversos derivados de ferroceno em solução. Esta subsecção teve como primeiro objetivo o de ganhar experiência em ensaios envolvendo processos de eletroquimioluminescência (dominar a metodologia de perturbação eletroquímica e aquisição simultânea de um sinal ótico), envolvendo a construção de diversas células eletroquímicas para os estudos com os diferentes elétrodos e com ou sem fluxo. O segundo objetivo foi o de contribuir para o avanço científico face ao que se encontrava reportado, para os estudos destes derivados em solução na reação de EQL Luminol/H₂O₂. De fato até ao momento não tinham sido reportados estudos analisando a influência da força iónica, razão luminol/derivado de ferroceno e comparação dos resultados obtidos em fase estacionária versus em fluxo, para este sistema.

Os resultados obtidos vêm de encontro aos publicados por outros autores, nomeadamente na evidência da inabilidade de mediação da reação pelos mediadores em solução, quando testados em superfícies de ouro, mas a sua eficaz mediação quando perturbados electroquimicamente num eléctrodo de ITO.

De revelar que mesmo para a superfície de ouro limpa, apesar de não se verificar uma separação notória no potencial ao qual ocorrem os processos de oxidação (ferroceno e luminol), ocorre uma intensificação do sinal recolhido quando na presença de mediadores. No entanto, e perante os melhores resultados obtidos com ITO, deu-se primazia a estas superfícies de eléctrodo.

Para a superfície de ITO conseguiu-se uma separação de cerca de 400 mV entre o processo de electrooxidação do ferroceno e luminol, após a otimização das condições experimentais. A seleção do ferroceno dicarboxílico, numa solução a pH 9.4, como o mais eficaz corroborou uma vez mais os resultados já reportados. É de salientar que a escolha do derivado de ferroceno que melhor catalisa a reação é extremamente dependente do valor de pH a que se realiza o ensaio. Deste modo, os resultados sistematizados neste trabalho são uma ferramenta relevante em estudos de mediação do sistema luminol e H₂O₂, permitindo escolher o derivado de ferroceno mais apropriado às condições ótimas do sistema que se pretender investigar.

A variação da força iónica da solução (para concentrações de NaClO₄ entre 0.05 e 0.5 M) não demonstrou influência significativa quer na posição (valor de potencial) quer na magnitude do sinal ótico obtido. A alteração da razão de luminol/derivado de ferroceno utilizada permitiu verificar que à medida que se aumenta a quantidade de ferroceno presente, mantendo a concentração de luminol constante, ocorre uma intensificação da quantidade de luz emitida, assim como um deslocamento para valores menos positivos de potencial ao qual o processo se inicia. Entre várias razões estudadas a que melhores resultados apresentou foi a de 1:20 (luminol:derivado de ferroceno).

Em posse das condições ótimas, a reação de EQL foi testada nestas condições, recorrendo à aplicação de pulsos de potencial de 0 a 450 mV, comprovando que a oxidação é feita através do mediador (ferroceno dicarboxílico), e não pela oxidação direta do luminol/ H_2O_2 .

Para os ensaios realizados em regime de independência de transporte de massa (em fluxo) a estabilidade do sinal ótico recolhido, durante a aplicação de pulsos consecutivos de potencial, é superior quando na presença do mediador.

Após estes estudos iniciais o trabalho seguinte consistiu na tentativa de aproximação a um sistema de EQL, com todos os reagentes imobilizados, tendo-se focado neste capítulo a imobilização do mediador.

Para tal procedeu-se à síntese de um polieletrólito catiónico contendo grupos ferrocenos (Fc-PAH) e sua adsorção na superfície do eletrodo pela metodologia de camada por camada, recorrendo ao PSS como contrapartida aniónica.

Apesar de existirem inúmeras aplicações de eletrodos modificados com polieletrólitos contendo compostos organometálicos com propriedades redox na sua estrutura, (biossensores eletroquímicos, células de combustíveis enzimáticas, eletrocatalise, etc) que se tenha conhecimento este é o primeiro trabalho que recorre a estes materiais para catalisar a reação de quimioluminescência entre o luminol e o peróxido de hidrogénio.

A caracterização por via eletroquímica das superfícies modificadas com estes polímeros, permitiu não só demonstrar a viabilidade da síntese orgânica destes, como avaliar a quantidade de material eletroativo depositado entre cada modificação. Com base nas variações de correntes de pico com a velocidade de varrimento imposta, para ensaios recorrendo a voltametria cíclica, foi possível identificar os diferentes mecanismos do processo de transferência de carga para eletrodos contendo diferentes camadas e em diferentes condições experimentais (pH, força iónica).

Os eletrodos modificados apresentaram uma elevada estabilidade eletroquímica da sua resposta quando testados em meio ácido (HClO_4 0.1 M) constatado pela estabilidade das correntes de oxi-redução dos grupos redox adsorvidos, quando submetidos a varrimentos sucessivos de potencial. Em meios aquosos com pH compreendido entre 4 e 9, o varrimento consecutivo de potencial traduziu-se numa perda de material eletroativo disponível. Esta perda de resposta por parte dos grupos ferrocenos disponíveis não é desejada pois impede o uso desta plataforma em biossensores nomeadamente quando se deseja efetuar diversas determinações analíticas com a mesma plataforma.

Foram executados diversos ensaios na tentativa de compreender e colmatar esta perda de eletroatividade. O estudo da presença de diferentes aniões na solução em que se realiza a sua caracterização, não revelou qualquer desvio significativo a este comportamento. Mesmo quando realizados na presença de aniões, que promovem a degradação do ferroceno no seu estado oxidado, parecendo indicar que não está envolvida a degradação dos centros redox.

A modificação com camadas sucessivas de polieletrólitos catiónicos e aniónicos, e consequente adsorção de mais material eletroativo, também não contribuiu de forma significativa para uma melhoria da estabilidade eletroquímica.

Perante estes resultados obtidos em ITO fica em aberto se ocorre uma desadornoção de material polimérico da superfície do elétrodo quando imerso em soluções de pH superiores a 4, ou se existe uma alteração estrutural do polímero que reduz a acessibilidade aos grupos ferroceno, diminuindo consequentemente o número de centros ativos disponíveis para o processo de transporte de carga. Um estudo gravimétrico por microbalança de cristal de quartzo poderia dar uma resposta a esta questão.

Com o intuito de ultrapassar esta falta de estabilidade foi ainda investigado o comportamento de elétrodos de ouro modificados com uma monocamada de alcanotóis contendo um grupo cabeça iónico, MPS. Nestes estudos, demonstrou-se a formação destas monocamadas em elétrodos de ouro, estudando-se as condições experimentais da sua formação, tendo em vista um substancial recobrimento superficial e o eventual bloqueio de espécies aniónicas eletroativas em solução, *e.g.* luminol.

Tal como o observado em elétrodos de ITO, também nestas superfícies (Au-MPS/polímeros) se verificou uma elevada estabilidade da resposta dos grupos ferroceno em meio ácido, mas a sua perda de eletroatividade quando testados em soluções neutras ou básicas.

Os resultados descritos antevêm alguma dificuldade de aplicação prática desta metodologia numa plataforma de biossensores para uso continuado. De realçar no entanto que em virtude da reprodutibilidade das modificações observadas é de esperar que a sua aplicação numa perspetiva de elétrodos descartáveis poderá ser viável. A metodologia desenvolvida demonstrou um significativo aumento do sinal de EQL observado o que poderá implicar a deteção de concentrações subnanomolares de peróxido de hidrogénio, e consequentemente antever a necessidade de menor quantidade de enzimas depositadas na superfície do elétrodo. O aumento significativo do sinal ótico registado na presença dos mediadores prevê que se poderá construir sistemas analíticos recorrendo a sensores óticos menos sensíveis, fotodíodos, em detrimento de tubos fotomultiplicadores.

2.6 Referências bibliográficas

- 1 Roriz, Paulo, Frazão, Orlando, Lobo-Ribeiro, António B., and Simões, José L. Santos e José A. Review of fiber-optic pressure sensors for biomedical and biomechanical applications. *Journal of Biomedical Optics*, 18, 5 (2013), 1-18.
- 2 Feng Long, Anna Zhu e Hanchang Shi. Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning. *Sensors*, 13 (2013), 13928-13948.
- 3 Spindel, Samantha. Evaluation of Optical Detection Platforms for Multiplexed Detection of Proteins and the Need for Point-of-Care Biosensors for Clinical Use. *Sensors*, 14, 12 (2014), 22313 -22341.
- 4 Gooding, J. Justin. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends (2006), 137–151.
- 5 Farahi, Jose Luis Santos e Faramarz, ed. *Handbook of Optical Sensors*. CRC Press , 2014.
- 6 Aldo RodaMara Mirasolia, Elisa Michelinia, Massimo Di Fuscoa, Martina Zangheria, Luca Ceveninia, Barbara Rodaa, Patrizia Simonc. Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review. *Biosensors and Bioelectronics*, 76 (2016), 164–179.
- 7 Karsten A Fährnich, Miloslav Pravda e George G Guilbault. Recent applications of electrogenerated chemiluminescence in chemical analysis. *Talanta*, 54, 4 (2001), 531–559.
- 8 Xu, Lianzhe Hua e Guobao. Applications and trends in electrochemiluminescence. *Chemical Society Reviews*, 39, 8 (2010), 3275 - 304.
- 9 Knight, Andrew W. A review of recent trends in analytical applications of electrogenerated chemiluminescence. *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 1 (1999), 47–62.
- 10 Xiao-mei Chen, Bing-yuan Su, Xin-hong Song, Qing-ai Chen, Xi Chen e Xiao-ru Wang. Recent advances in electrochemiluminescent enzyme biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 5 (2011), 665-676.
- 11 O. V. Reshetnyaka, E. P. Koval'chuk e J. Baejowski. Role of Molecular Oxygen and Its Active Forms in Generation of Electrochemiluminescence. *Russian Journal of Electrochemistry*, 47, 10 (2011), 1111–1118.
- 12 Wei Wang, Hua Cui, Zhao-Xiang Deng, Yong-Ping Dong e Ji-Zhao Guo. A general E-E/C mechanism for the counter-peak in luminol electrochemiluminescence. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612, 2 (2008), 277–287.
- 13 Hua Cui, Gui-Zheng Zou e Xiang-Qin Lin. Electrochemiluminescence of

- Luminol in Alkaline Solution at a Paraffin-Impregnated Graphite Electrode. *Analytical Chemistry*, 75, 2 (2003).
- 14 Sakura, Sachiko. Electrochemiluminescence of hydrogen peroxide-luminol at a carbon electrode. *Analytica Chimica Acta*, 262, 1 (1992), 49-57.
 - 15 Tifeng Jiao, Qinqin Huang, Yong Xiao, Xihai Shen, Jingxin Zhou, and Faming Gao. Electrochemiluminescent Detection of Hydrogen Peroxide via Some Luminol Imide Derivatives with Different Substituent Groups. *Journal of Chemistry*, 2013 (2013).
 - 16 N.M., Rao and T.A., Hool K. e Nieman. Evaluation of luminol immobilization approaches for chemiluminescence determinations in flowing streams. *Analytica Chimica Acta*, 266 (1992), 279.
 - 17 Kalinowski, Stanislaw Koronkiewicz e Slawomir. Direct-injection chemiluminescence detector. Properties and potential applications in flow analysis. *Talanta*, 133 (2015), 112–119.
 - 18 Lihua Yang et. al. Study on Enhancement Principle and Stabilization for the Luminol-H₂O₂-HRP Chemiluminescence System. *Plos One* (2015), 1-14.
 - 19 Parvez Khan et. al. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 2 (2014), 333–355.
 - 20 R. Wilson and D.J. Schiffrin. Chemiluminescence of Luminol Catalyzed by Electrochemically Oxidized Ferrocenes. *Analytical Chemistry*, 68 (1996), 1254-1257.
 - 21 R. Wilson and D.J. Schiffrin. Electrochemically oxidized ferrocenes as catalysts for the chemiluminescence oxidation of luminol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 448 (1998), 125.
 - 22 Charles E Taylor IV and Stephen E Creager. Electrochemiluminescence-based detection of ferrocene derivatives at monolayer-coated electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 485 (2000), 114–120.
 - 23 Yukari Sato, Takahiro Sawaguchi and Fumio Mizutani. Potential-dependent chemiluminescence of luminol on the gold electrode modified with ferrocenylalkanethiol self-assembled monolayer. *Electrochemistry Communications*, 3, 3 (2001), 131–135.
 - 24 Yukari Sato, Soichi Yabuki e Fumio Mizutani. Electrochemiluminescence of Luminol Generated at Self-Assembled Monolayer of. *Chemistry Letters* (2000), 1330-1331.
 - 25 Yukari Sato et. al. Electrochemical Chemiluminescence Responses on Gold Electrodes modified polydivinylferrocene. *Electrochemistry*, 2 (2006), 202-204.
 - 26 Richard G. Jones, Jaroslav Kahovec, Robert Stepto, Edward S. Wilks, Michael Hess, Tatsuki Kitayama, W. Val Metanowski, ed. *Compendium of*

- Polymer Terminology and Nomenclature (IUPAC Recommendations 2008)*. RSC Publishing, Cambridge, 2008.
- 27 Joachim Koetz and Sabine Kosmella. *Polyelectrolytes and Nanoparticles*. Springer Laboratory, Berlin/Heidelberg, 2007.
- 28 Tsetska Radeva, ed. *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*. CRC Press, 2001.
- 29 R.K. Iler. Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 21, 6 (1966), 569-594.
- 30 Gero Decher and Jong-Dal Hong. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromolekulare Chemie, Macromolecular Symposia*, 46, 1 (1991), 321-327.
- 31 G. Decher and J. D. Hong. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: II. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 95, 11 (1991), 1430-1434.
- 32 Rubner, S. S. Shiratori e M. F. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules*, 33, 11 (2000), 4213–4219.
- 33 McCarthy, Wei Chen e Thomas J. Layer-by-Layer Deposition: A Tool for Polymer Surface. *Macromolecules*, 30 (1997), 78-86.
- 34 Eugenia Kharlampieva, Veronika Kozlovskaya e Svetlana A. Sukhishvili. Layer-by-Layer Hydrogen-Bonded Polymer Films: From Fundamentals to Applications. *Advanced materials*, 21 (2009), 3053–3065.
- 35 Sami Valkama et. al. Multicomb Polymeric Supramolecules and Their Self-Organization: Combination of Coordination and Ionic Interactions. *Macromolecular rapid communications*, 24, 9 (2003), 556 -560.
- 36 Yajun Wang, Alexandra S. Angelatos e Frank Caruso. Template Synthesis of Nanostructured Materials via Layer-by-Layer Assembly. *Chemistry of Materials*, 20, 3 (2008), 848 -858.
- 37 A. Izquierdo, S. S. Ono, J.-C. Voegel, P. Schaaf e G. Decher. Dipping versus Spraying: Exploring the Deposition Conditions for Speeding Up Layer-by-Layer Assembly. *Langmuir*, 21 (2005), 7558-7567.
- 38 Johannes Schmitt, Torsten Gruenewald, Gero Decher, Peter S. Pershan, Kristian Kjaer e Mathias Loesche. Internal structure of layer-by-layer adsorbed polyelectrolyte films: a neutron and x-ray reflectivity study. *Macromolecules*, 26, 25 (1993), 7058–7063.
- 39 Jose Hodak, Roberto Etchenique e Ernesto J. Calvo. Layer-by-Layer Self-Assembly of Glucose Oxidase with a Poly(allylamine)ferrocene Redox Mediator. *Langmuir*, 13 (1997).

- 40 Chen, Guo-Fang Zhang e Hong-Yuan. Studies of polyluminol modified electrode and its application in electrochemiluminescence analysis with flow system. *Analytical Chimica Acta*, 419, 1 (2000), 25–31.
- 41 V. Ferreira, A.C. Cascalheira e L.M. Abrantes. Electrochemical preparation and characterisation. *Thin Solid Films* , 516 (2008), 3996–4001.
- 42 Allen J. Bard, ed. *Electrogenerated Chemiluminescence*. Marcel Dekker, Inc, New York, 2004.
- 43 Szabo, G. Inzelt e L. The effect of the nature and the concentration of counter ions on the electrochemistry of poly(vinylferrocene) polymer film electrodes. *Electrochimica Acta*, 31, 11 (1986), 1381-1387.
- 44 Leech, Huangxian Ju e Donal. Effect of electrolytes on the electrochemical behaviour of 11-(ferrocenylcarbonyloxy)undecanethiol SAMs on gold disk electrodes. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 1 (1990), 1549 - 1554.
- 45 Faulkner, Allen J. Bard e Larry R. *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*. Jonh Wiley & Sons, New York, 1980.
- 46 Jason Stotter, Yoshiyuki Show , Shihua Wang , and Greg Swain. Comparison of the Electrical, Optical, and Electrochemical Properties of Diamond and Indium Tin Oxide Thin-Film Electrodes. *Chem. Mater*, 17 (2005), 4880-4888.
- 47 Moonjeong Choi, Kyungmin Jo e Haesik Yang. Effect of Different Pretreatments on Indium-Tin Oxide Electrodes. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 34, 2 (2013), 421-425.
- 48 Rashida N. Smith, Mark McCormick, Christopher J. Barrett, Linda Reven, and Hans W. Spiess. NMR Studies of PAH/PSS Polyelectrolyte Multilayers Adsorbed onto Silica. *Macromolecules*, 37 (2004), 4830-4838.
- 49 Choi J and Rubner MF. Influence of the Degree of Ionization on Weak Polyelectrolyte Multilayer Assembly. *Macromolecules*, 35 (2005), 116–124.
- 50 Anzai, Shigehiro Takahashi e Jun-ichi. Recent Progress in Ferrocene-Modified Thin Films and. *Materials*, 6 (2013), 5742-5762.
- 51 Stephen A. Merchant, Daniel T. Glatzhofer e David W. Schmidtke. Effects of Electrolyte and pH on the Behavior of Cross-Linked Films of Ferrocene-Modified Poly(ethylenimine). *Langmuir*, 23 (2007), 11295-11302.
- 52 Aihua Liu, Yoshitomo Kashiwagi e Jun-ichi Anzai. Polyelectrolyte Multilayer Films Containing Ferrocene: Effects of Polyelectrolyte Type and Ferrocene Contents in the Film on the Redox Properties. *Electroanalysis*, 15 (2013), 1139-1142.
- 53 Cheikh Mokrani, Julien Fatisson, Liliane GueÂrente, and Pierre Labbe. Structural Characterization of (3-Mercaptopropyl)sulfonate Monolayer on Gold Surfaces. *Langmuir* , 21 (2005), 4400-4409.

- 54 Zhan-Hui Wang, Ana S. Viana, Gang Jin, and Luísa M. Abrantes. Immunosensor interface based on physical and chemical immunoglobulin G adsorption onto mixed self-assembled monolayers. *Bioelectrochemistry*, 69, 2 (2006), 180-186.
- 55 J.F. Cabrita, L.M. Abrantes, and A.S. Viana. N-Hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation. *Electrochimica Acta*, 50, 10 (2005), 2117–2124.
- 56 Alice H. Suroviec. Determining Surface Coverage of Self-Assembled Monolayers on Gold Electrodes. *The Chemical Educator*, 17 (2012), 83-85.
- 57 Whitesides, Lou Strong e George M. Structures of self-assembled monolayer films of organosulfur compounds adsorbed on gold single crystals: electron diffraction studies. *Langmuir*, 4, 3 (1988), 546–558.

Capítulo 3

Desenvolvimento de um novo equipamento para a deteção rápida e simples de Ocratoxina A em cereais e vinho

Parte do trabalho apresentado neste capítulo foi objeto da seguinte publicação:

R. R. G. Soares¹; **Diogo Ramadas**¹; V. Chu; M. R. Aires-Barros, J. P. Conde; A. S. Viana e A. C. Cascalheira, “An ultrarapid and regenerable microfluidic immunoassay coupled with integrated photosensors for point-of-use detection of ochratoxin A”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2016**, vol. 235, pp 554-562.

¹ Contribuição em partes iguais.

3.1. Resumo

Dado o crescente ritmo em que novos produtos alimentares são produzidos e comercializados por todo mundo, garantir a segurança alimentar humana e animal é um dos grandes desafios da sociedade moderna. A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos quer no campo quer durante o armazenamento de alimentos, com grandes implicações na saúde, estando cada vez mais associada a doenças crônicas e agudas, como carcinogénese provocando também toxicidade hepática. Atualmente, os métodos de deteção padrão certificados, baseados em metodologias de cromatografia, são complexos, demorados (> 1 hora) e necessitam de pessoal especializado para serem executados. Assim sendo, existe uma grande e crescente procura de métodos alternativos para controlar e monitorizar eficazmente os níveis de micotoxinas antes ou após colheitas, durante o transporte ou armazenagem, de preferência rápido, simples e portátil.

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos no âmbito da participação num projeto europeu, no qual a empresa Lumisense Lda fez parte do consórcio, Demotox, cujo objetivo final consistiu na construção de um equipamento portátil para a deteção de OTA.

O projeto Demotox foi uma ação de demonstração dos resultados provenientes de um projeto anterior denominado Otasens. Este projeto (Otasens) teve como objetivo final o desenvolvimento de um protótipo laboratorial capaz de detetar OTA de uma forma simples e rápida. O protótipo laboratorial desenvolvido demonstrou excelentes resultados, recorrendo a imunoensaios miniaturizados para a deteção de OTA, abrindo as portas para que um novo projeto demonstrador (Demotox) fosse submetido e aprovado, tendo em vista o desenvolvimento de um protótipo pré-industrial para deteção de OTA em cereais e vinho. No decorrer do projeto Demotox, desenvolveu-se um protótipo pré-industrial de identificação semi-quantitativa para a deteção de OTA em cereais, vinho para os valores legais na união europeia. O protótipo é portátil de pequena dimensão, com uma interface simples e intuitiva para o utilizador, e de rápida resposta.

Os trabalhos realizados no âmbito da participação no projeto e no âmbito deste doutoramento englobaram: o desenvolvimento necessário para alterar o sistema de fluídica: a conceção, desenho, construção e teste de bomba peristáltica miniatura; elaboração dos requisitos para redesenhar a placa eletrónica de controlo do equipamento; desenvolvimento do *software* de controlo embebido (*firmware*) e alteração do formato do imunoensaio de modo melhorar o desempenho do teste.

O método selecionado para a deteção de Ocratoxina A recorreu a uma metodologia denominada por ELISA. ELISA, do termo inglês (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*), ou ensaio imunoenzimático em suporte sólido, a qual é baseada no princípio da interação específica entre anticorpo e antígeno (OTA).

A técnica ELISA foi miniaturizada, recorrendo a estruturas de microfluídica, e aplicada no formato de um imunoensaio competitivo direto demonstrando-se eficiente na deteção da toxina. O novo protótipo e respetivas estruturas microfluídica revelaram-se eficientes para a deteção de OTA em vinho no limite legal de 2 ng/mL, sendo o protótipo validado também para a deteção de OTA em cereais de alimentação animal

para 50 ppb, cinco vezes inferior ao limite legal estabelecido pela união europeia, podendo facilmente o ensaio ser ajustado para a detecção no limite legal de 250 ppb.

3.2. Introdução

Garantir um elevado grau de qualidade e segurança nos produtos alimentares é uma grande exigência das sociedades atuais, contudo garantir esta mesma qualidade é um enorme desafio. A degradação de produtos alimentares por fatores bióticos e em particular por fungos demonstra ser um problema generalizado. Este fenómeno deve-se também à capacidade de fungos produzirem micotoxinas. As micotoxinas são pequenas moléculas orgânicas produzidas por fungos filamentosos durante o crescimento sob condições favoráveis de temperatura e humidade[1]. Existem inúmeras micotoxinas, sendo conhecidas mais de 300 tipos, que são encontradas em regiões específicas do mundo, principalmente naquelas com condições climáticas propícias para o seu crescimento, sendo a contaminação da alimentação humana e animal através de micotoxinas um problema mundial[2].

Estima-se que cerca de 25% da produção agrícola em todo o mundo tem algum grau de contaminação com micotoxinas. Estas toxinas afetam igualmente a saúde animal, o que implica um considerável impacto económico devido a uma diminuição no desempenho e produtividade[3].

As micotoxinas estão relacionadas com efeitos tóxicos para a vida humana e animal e são atualmente consideradas um dos mais perigosos contaminantes alimentares[4], estando associados a efeitos cancerígenos[5], neurotóxicos[6], disruptores endócrinos[7] e imunodepressores[8] tanto mais por serem bastante resistentes aos tratamentos térmicos, utilizados no processamento alimentar.

Entre as diversas micotoxinas produzidas por fungos, a Ocratoxina A (OTA), merece particular atenção, devido ao seu impacto toxicológico grave, causando diversos efeitos de nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, teratogenicidade e imunotoxicidade, em seres humanos e animais[6].

A OTA é um composto cristalino incolor cujo nome químico é (R)-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il) carbonil] – L-fenilalanina e cuja fórmula química se representa na Figura 3.1. Trata-se de uma dihidro-isocumarina unida a um grupo L-fenilalanina por uma ligação peptídica.

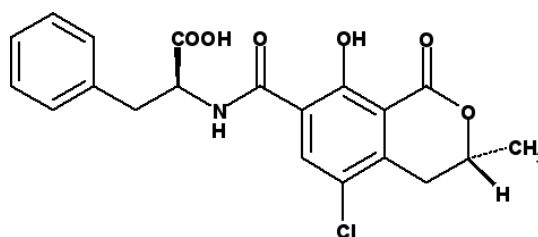


Figura 3.1 – Estrutura molecular da Ocratoxina A

As principais espécies de fungos responsáveis pela produção de OTA são *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* e o chamado *Aspergilli niger* (*A. Carbonarius* e *A. Niger agregado*). Estes fungos aparecem consoante o tipo de produto, a envolvente e a região geográfica. *Penicillium verrucosum* é o principal

responsável por contaminações de OTA em regiões frias, uma vez que cresce a temperaturas inferiores a 30°C. Para os países do norte da Europa a contaminação com OTA originária deste fungo é comum em cereais e seus produtos derivados como cerveja e tecidos comestíveis de origem animal, alimentados com ração contaminada. O *Aspergillus ochraceus* cresce em temperaturas moderadas e não superiores a 30°C, e aparece em produtos alimentares como cereais ou grãos de café. No que respeita ao grupo de *Aspergillus niger*, cresce a temperaturas elevadas, aproximadamente 30°C e é responsável pela contaminação por OTA em regiões com clima quente, tendo sido a sua presença reportada em frutos secos e maduros, especialmente em uvas. Recentemente o *Aspergillus carbonarius* e em menor escala o *Aspergillus niger* têm sido reconhecidos como os principais responsáveis pela contaminação de OTA em vinho[9][10].

Na tabela seguinte é possível verificar de forma compilada as principais características dos fungos produtores de OTA.

Tabela 3.1 - Principais características dos fungos produtores de OTA

Género <i>Aspergillus</i>	Género <i>Penicillium</i>
Crescimento a temperaturas mais altas:	
<i>A. ochraceus</i> 8-36°C (Max 31°C)	Crescimento a temperaturas <30°C
<i>A. carbonarius</i> 32-35°C	(Max a 20°C)
<i>A. niger</i> 8-47°C (Max 37°C)	
Contaminante de café, uvas, passas	Contaminante de cereais armazenados e carne
Regiões mais quentes e dos trópicos	Norte e centro da Europa e Canadá

O aparecimento de OTA nos vinhos é uma questão emergente, pois tem sido relatada na maior parte das regiões vinícolas do mundo em especial no sul da Europa. A Europa representa 75% da produção mundial de vinho e 40% da área plantada de vinhas[11], sendo o vinho um dos produtos mais exportados, a monitorização da sua qualidade é uma grande preocupação e necessidade, pois pode por em causa a saúde humana e ter sérias repercussões a nível económico.

Devido ao potencial de toxicidade da OTA e ao aumento da quantidade de produtos alimentares que estão a ser produzidos e comercializados em todo o mundo, a sua presença na alimentação humana e animal é uma questão de grande preocupação para ser deixada sem regulamentação e monitorização. O número de países com regulamentações específicas para contaminações pela OTA tem vindo a aumentar de apenas 33 em 1981 para 100 em 2003[12]. Atualmente, a União Europeia (UE) estabelece limites máximos para a OTA num vasto leque de produtos alimentares e tem o regulamento mais rigoroso no mundo, tanto em termos de limites mais baixos como no âmbito de matrizes e toxinas abrangidos pela lei. Esses limites, dependem do produto alimentar, variam de 2 ng/mL para vinhos, 3 ng/g em cereais processados até 15 ng/g em especiarias[13].

Desenvolvimento recente na análise de Micotoxinas.

A importância da análise destes compostos é bem patente pelo fato de existir um jornal científico totalmente dedicado a micotoxinas, “World Mycotoxin Journal², onde anualmente se publica um artigo de revisão referente aos avanços no estado da arte dos métodos de análise de micotoxinas (e.g. F. Berthiller *et. al*, “*Developments in mycotoxin analysis: an update for 2014-2015*”, World Mycotoxin Journal: 9 (1),2016.)

A investigação neste campo tem sido muito ativa nos últimos anos, com estratégias que vão desde simples imunoensaios colorimétricos de membrana[14], imunoensaios em sistemas microfluídicos com detetores óticos integrados[15] até sensores complexos ultrassensíveis baseados em aptâmeros compreendendo várias estratégias de amplificação química[16][17][18]. Quanto a estes últimos, há um número significativo de publicações recentes alegando sensibilidades altas usando aptâmeros imobilizados para capturar OTA, que se baseiam tanto na detecção sem marcador [19][20][21] ou na detecção de um sinal proveniente de uma sonda marcada, previamente hibridizada com o aptâmero[22][23]. Têm sido reportados resultados excelentes a nível de sensibilidades, como por exemplo 2 ng/mL, utilizando agregados de nanopartículas de prata e partículas magnéticas funcionalizadas com aptâmeros[24] e menos de 1 ppt usando amplificação circular de rolamento do aptâmero desacoplado juntamente com uma sequência alvo marcada com pontos quânticos para amplificar o sinal quando a OTA não está presente em solução[18]. No entanto, estes ensaios são extremamente complexos em termos da química e da operação e requerem reagentes muito dispendiosos. Além disso, atualmente debate-se a questão de se realmente são necessários limites de detecção (LOD) tão baixos (pelo menos \approx 1000 vezes abaixo dos limites regulamentares) em casos que procedimentos eficazes de preparação/extração de amostras estão disponíveis. Outra desvantagem destes ensaios são os tempos longos de execução de mais de uma hora, o que constitui um fator altamente limitante para aplicações de triagem no local. Na verdade, através da revisão da literatura recente, os ensaios mais rápidos, mesmo com a perda de sensibilidade, necessitam de pelo menos 15 minutos, muitas vezes acoplados a um processo de regeneração igualmente longo para evitar procedimentos de imobilização de moléculas complexas. Estratégias tradicionais baseadas em imunoensaios colorimétricos descartáveis de fluxo lateral foram implementadas em vários *kits* comerciais altamente sensíveis e portáteis, tais como o RevealQ+ da Neogen³, ROSA® da Charm⁴ e Ochrasensor da Unisensor⁵ em que os tempos de análise são de 9, 10 e 5 minutos, respetivamente.

O método selecionado para a detecção de Ocratoxina A ao longo deste trabalho recorreu à metodologia denominada por ELISA. ELISA, do termo inglês (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), ou ensaio imunoenzimático em suporte sólido é baseada no princípio da interação específica entre anticorpo e antígeno (OTA).

² <http://www.wageningenacademic.com/loi/wmj>

³ <http://www.neogen.com>

⁴ <https://www.charm.com>

⁵ <https://unisensor.be>

Otasens⁶.

Grandes empresas normalmente têm os meios e os recursos humanos para efetuar quantificação de OTA internamente, contudo o problema centra-se nas pequenas e médias empresas (PME). As PME produtoras de bebidas e alimentos necessitam de mandar analisar externamente, em laboratórios certificados, as amostras para a deteção de OTA, o que acarreta um gasto extra bastante elevado para empresas com recursos limitados, em particular pequenos produtores de vinho, para estes a aplicação de técnicas ou dispositivos de monitorização complexos é inviável.

Neste cenário, é evidente que o desenvolvimento de métodos de análise com boa seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade e que ao mesmo tempo apresentem baixo tempo de ensaio, baixo custo e métodos pouco poluentes são bastante atrativos para as PME. Na tentativa de entrar neste nicho de mercado e solucionar um problema existente, nasceu o projeto europeu Otasens.

O objetivo científico e tecnológico do projeto consistiu em melhorar significativamente a facilidade de deteção de Ocratoxina A em vinho e rações para animais à base de cereais. Para atingir o objetivo proposto o consórcio propôs-se a desenvolver um sistema de deteção portátil capaz de monitorizar OTA em vinho, cerveja e rações para animais à base de cereais com as seguintes características em comparação com as existentes nos laboratórios certificados:

- Redução de tempo dos processos analíticos.
- Redução do custo por análise.
- Redução da quantidade de solventes orgânicos utilizados.
- Redução do uso de mão-de-obra especializada.

O projeto visava o progresso tecnológico no desenvolvimento de um sistema portátil inovador que realizasse a deteção e quantificação de OTA por meio de uma matriz linear de fotodíodos de silício, sensores esses que irão monitorizar superfícies funcionalizadas de duas maneiras distintas, descritas em seguida, a fim de obter os melhores desempenhos em diferentes analitos e matrizes alimentares.

Para obtenção de resultados o consórcio optou por usar duas abordagens distintas, que foram:

1. Sistema de deteção inteligente para cromatografia de camada fina (TLC), onde os fotodíodos de silício são integrados com uma placa de TLC de modo a adquirir a fluorescência intrínseca da OTA quando exposta a iluminação UV.
2. Um sistema de deteção ótica onde os fotodíodos são acoplados a uma superfície modificada para a aquisição de luminescência proveniente da

⁶ "Novel photosensor-based device for rapid and quantitative ochratoxin A determination in wine, beer and feed" (OTASENS) financiado pelo FP7-SME (Specific Programme "Capacities": Research for the benefit of SMEs), referencia 232245. Realizado entre 2009-12-01 a 2011-11-30.

reação anticorpo-antigénio envolvendo o analíto em causa, OTA, e uma solução de luminol e peróxido de hidrogénio.

As duas abordagens foram desenvolvidas por diferentes grupos, o sistema descrito como número 1, foi desenvolvido pelo grupo “La Sapienza” da Universidade de Roma, com cooperação da empresa italiana “Automation, Srl”, enquanto que o segundo sistema foi desenvolvido pelo grupo “INESC Microsistemas e Nanotecnologias” com a empresa portuguesa “Lumisense, Lda”.

Para o interesse neste trabalho, iremos unicamente focar-nos nos resultados obtidos para o segundo sistema mencionado.

Os resultados obtidos no final do projeto Otasens foram os seguintes:

O protótipo final do sistema de micro-imunoensaio para a deteção de OTA em vinho e cereais foi demonstrado e testado com matrizes complexas, provando a possível determinação num sistema sim/não para um limite pré-determinado. De acordo com resultados expressos no relatório final do projeto o valor de contaminação de OTA testado foi de 100 ng/mL, sendo que os resultados obtidos em matrizes de vinho tinto não foram muito satisfatórios uma vez que as antocianinas presentes na matriz mascaram o sinal.

Os vários sistemas que compõem o sistema integrado final (protótipo laboratorial) são enunciados em seguida.

- Sensor ótico para detetar quimioluminescência.
- Placa circuito impresso com a eletrónica para controlo e amplificação do sinal do detetor e microcontrolador de controlo do ensaio, aquisição de dados e comunicação USB.
- Bomba peristáltica, controlo de fluxo de soluções
- Detetor de bolhas, para garantir a inexistência de ar durante o processo de imobilização e aquisição de luz.
- Válvulas de pressão para controlo do rumo da solução.
- *Software* de interface com utilizador de modo a analisar resultados e manutenção e verificação do sistema.

O sistema de imunoensaio utilizado na versão final do projeto é reportado pelo grupo do INESC-MN[15] como um imunoensaio competitivo indireto, e é apresentado na seguinte figura.

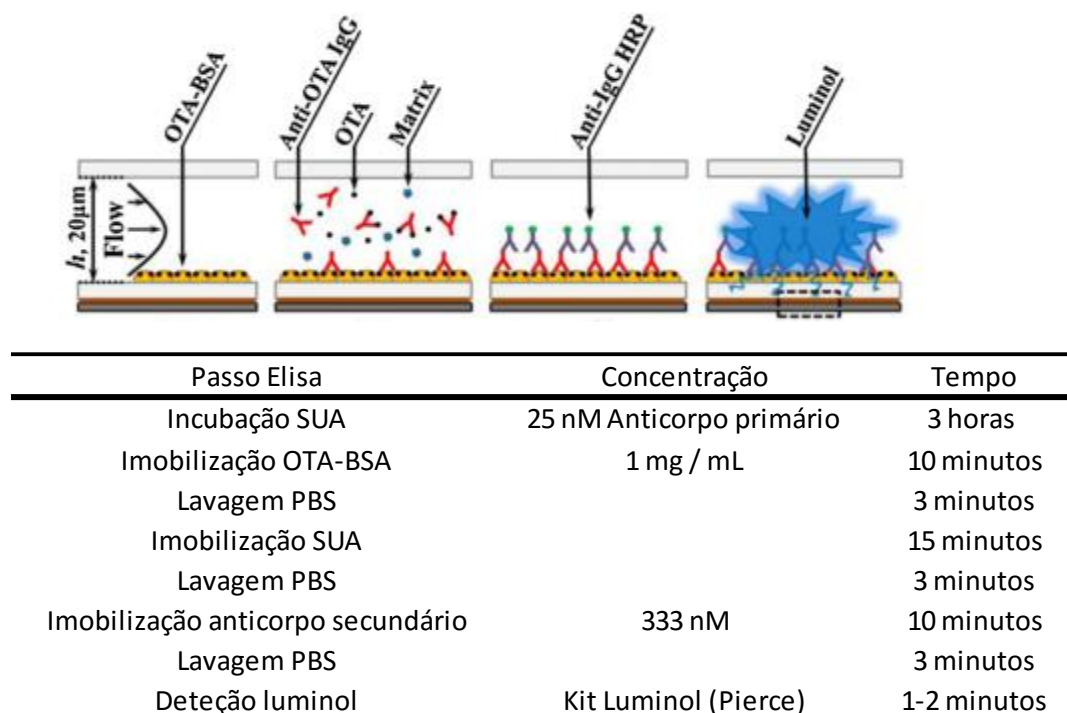


Figura 3.2 – Imunoensaio publicado resultante do projeto europeu e respetiva tabela com concentrações e tempos referentes a cada passo do ensaio. SUA representa a solução de amostra a analisar constituída por solução de amostra + solução de de anticorpo primário (adaptado de [15])

Com base nos resultados promissores obtidos e a partir do protótipo laboratorial criado pelo grupo INESC-MN, o consórcio decidiu avançar para um projeto demonstração, Demotox, com o objetivo de não só converter o protótipo laboratorial num protótipo pré-industrial mas fazer também uma análise do mercado a um produto com estas características.

Demotox⁷.

Tal como mencionado anteriormente o projeto Demotox foi um projeto demonstrador financiado pela comunidade europeia na sequência do projeto Otasens. O objetivo consistiu em demonstrar que a tecnologia desenvolvida anteriormente era possível de converter em um equipamento pré-industrial, perto de entrada no mercado.

Para tal o novo protótipo devia obedecer a determinados requisitos pré-estabelecidos:

- Portabilidade, tamanho máximo: 25 x 10 x 5 cm
- Peso inferior a 1 Kg, compacto.
- Sensibilidade: menor que 1 ng/mL de OTA em tampão, para matrizes complexas (vinho tinto) prevê-se menor sensibilidade.

⁷ “A new device to detect quickly and friendly Ochratoxin A and other myco-toxins in feed, food and beverage” (DEMOTOX), financiado pelo FP7-SME (Specific Programme "Capacities": Research for the benefit of SMEs), referencia 604752. Realizado entre 2013-07-01 a 2015-06-30.

- Tempo de ensaio curto (uma ordem de magnitude menor que os ensaios tradicionais).
- Resposta rápida.
- Diminuição do uso de solventes orgânicos, maioritariamente usados em técnicas tradicionais.
- Preço total do protótipo inferior a 3000 €.
- Não requerer pessoal especializado para o ensaio.
- Conexão a um sistema informático e *software* de interface simples para o utilizador.

À empresa portuguesa Lumisense Lda coube o desenvolvimento de um protótipo pré-industrial do sistema com base no imunoensaio competitivo indireto desenvolvido pelo INESC-MN e respeitando as premissas acima enumeradas.

Ao longo deste capítulo estão apresentados os resultados respeitantes à minha participação neste projeto e por mim realizados.

3.3. Parte experimental

3.3.1. Equipamentos utilizados no desenvolvimento do projeto

Para a construção do protótipo e das estruturas microfluídicas em acrílico e PDMS utilizaram-se os seguintes equipamentos.

- Impressora 3D, Kossel⁸, construída no nosso laboratório utilizando recursos disponíveis *online*.

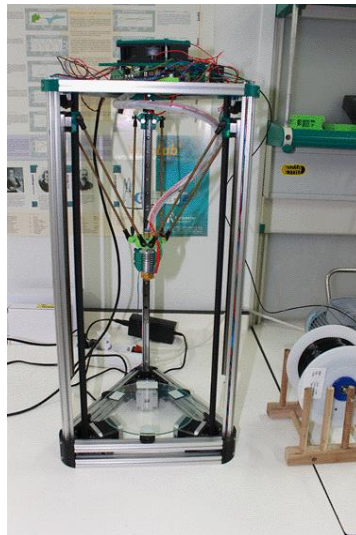


Figura 3.3 – Fotografia ilustrativa da impressora 3D utilizada ao longo do processo para o desenvolvimento do protótipo pré-industrial Demotox.

- Fresadora Proxxon mf-70, convertida num centro de maquinação computadorizado com acoplamento de motores e microcontroladores.



Figura 3.4 – Fotografia ilustrativa do centro de maquinação computadorizado utilizado no desenvolvimento do protótipo pré-industrial Demotox.

- Equipamento de descarga elétrica (tratamento por corona), para alterar a superfície de PDMS e permitir a sua colagem irreversível a outra camada de PDMS. Electro-Technic Products Inc (ETP), modelo BD-20.

⁸ <http://reprap.org/wiki/Kossel>



Figura 3.5 – Fotografia ilustrativa do equipamento de descarga elétrica utilizado para sensibilização de PDMS na construção de estruturas microfluídicas ao longo do projeto.

- Material comum de laboratório.

3.3.2. Reagentes

Na Tabela 3.2 encontra-se a lista de reagentes utilizados no decorrer do trabalho experimental.

Tabela 3.2 – Reagentes utilizados com o respetivo número CAS e marca do fornecedor.

Reagente	Número CAS	Marca
Ácido clorídrico	7647-01-0	Acros (37%)
Hidróxido de sódio	1310-73-2	Aldrich (98%)
Cloreto de sódio	7647-14-5	Aldrich (99.5%)
Cloreto de potássio	7447-40-7	Aldrich (99.5%)
Dihidrogenofosfato de potássio	7778-77-0	Merk (99.5%)
Dihidrogenofosfato de sódio	7558-80-7	Aldrich (99%)
Fosfato de sódio dibásico	7558-79-4	Aldrich (99%)
Fosfato de potássio dibásico	7758-11-4	Aldrich (98%)
Polietileno glycol Mw = 20K	25322-68-3	Aldrich
Kit de Luminol (SuperSignal West Femto)	----	Thermo Fisher
BSA, Albumina do soro bovino	9048-46-8	Aldrich (98%)
Anti-OTA-HRP, anticorpo policlonal de coelho purificado por afinidade específica contra a OTA e conjugado com peroxidase	-----	Immunechem

de rábano-de-cavalo (HRP)

OTA-BSA, Albumina de soro bovino conjugada com OTA	-----	Aldrich
Ocratoxina A (OTA-A)	303-47-9	Aldrich (98%)
3-aminopropiltietoxisilano (APTES)	919-30-2	Aldrich (99%)

3.3.3. Preparação de soluções e procedimentos

Preparação de tampão fosfato salino pH 7.2 (PBS 7.2).

Para um balão de 100 mL pesar:

- 0.8 g (136 mM) de cloreto de sódio (NaCl)
- 0.02 g (2.6 mM) de cloreto de potássio (KCl)
- 0.144g (10 mM) de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)
- 0.024 g (1.7 mM) de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

Perfazer o volume com água desionizada, medir o pH e acertar com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Preparação de PDMS para produzir as estruturas microfluídicas.

O kit de PDMS Sylgard® 184 é constituído pelo elastómero e endurecedor, as proporções usadas ao longo do trabalho foram de 10:1 em massa respetivamente. Após junção e homogeneização a mistura é introduzida num recipiente de vácuo de modo a retirar todo o ar presente e usada conforme a finalidade. O tempo de cura usado é de 60 minutos a 75°C.

O processo de fabrico de PDMS com cor preta é idêntico ao transparente à exceção da introdução de 50 μL de tinta-da-china comercial por cada grama de elastómero, e do tempo de cura de 90 minutos a 75°C.

Método de extração para amostras de vinho.

Pesar para um *ependorf* de 2mL:

- 164.4 mg (0.6 M) de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)
- 70.6 mg (0.29 M) de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4)
- 40 mg de (1 mM) Polietileno glicol Mw:20K

Juntar 1881 μL de vinho e 19 μL de uma solução de OTA com 100x a concentração pretendida de modo a ficar a concentração pretendida no volume final.

Homogeneizar a solução com auxílio de um *vortex* durante 20-30 segundos e centrifugar a 2000g durante 10 minutos.

Para preparar a amostra para análise (SUA, “*sample under analysis*”), retirar 10 μL da fase superior (escura) e juntar a 23.3 μL de solução de anticorpo com 2.85 $\mu\text{g/mL}$ apresentando concentração final após adição de amostra de 2 $\mu\text{g/mL}$.

O procedimento foi adoptado do procedimento já publicado por Soares e outros[25].

Método de extração para amostras de cereais.

Pesar para um *ependorf* de 2 mL, 400 mg de cereais a analisar e juntar 1.2 mL de solução de extração. Agitar vigorosamente com auxílio de um *vortex* durante 3 minutos e centrifugar 3 minutos a 8000 g ou 15 minutos a 2000 g.

Após a centrifugação aparece uma fase no topo do líquido, amarela e viscosa, essa é a fase de interesse. Recolher 20 μL dessa fase e voltar a centrifugar mais 2 minutos a 2000g. Para preparar a amostra para análise, retirar 10 μL do sobrenadante e adicionar 23.3 μL de anticorpo.

Este procedimento de extração foi desenvolvido pelo grupo do INESC-MN e está em fase de proteção intelectual, deste modo a solução de extração não nos foi transmitida.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Do protótipo laboratorial a um protótipo pré-industrial

O protótipo laboratorial desenvolvido pelo INESC-MN proveniente do projeto Otasens é apresentado na Figura 3.6. Com vista ao cumprimento dos requisitos técnicos estabelecidos para o protótipo pré-industrial a desenvolver ao longo deste projeto, estabeleceram-se determinadas metas para cada componente específico do produto.

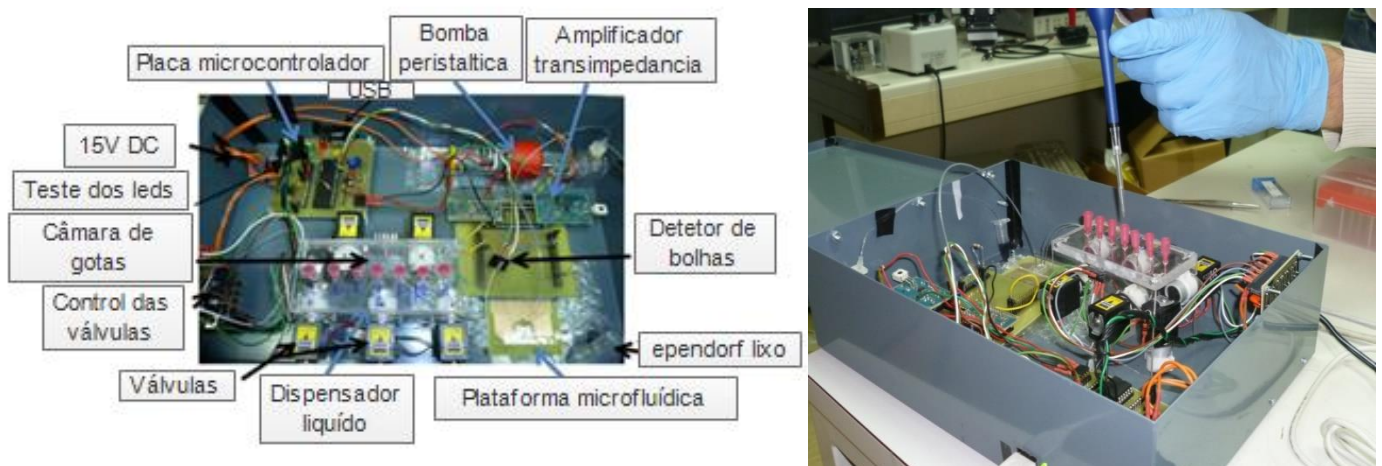


Figura 3.6 – Vista do interior (esquerda) e exterior (direita) do protótipo proveniente do Otasens.

Medidas propostas com intuito de atingir os objetivos traçados:

- Diminuir o tamanho do equipamento, diminuindo o tamanho dos seus constituintes principais.
 - Ajuste do sistema de fluídica.
 - Equipamento, deteção e estruturas microfluídicas.
 - Eletrónica.
- Reformulação do formato do imunoensaio de modo a ter menos um passo de reação permitindo a consequente diminuição do tempo total de ensaio.
- Construção de uma plataforma de interação e análise entre os resultados obtidos e o utilizador.
 - *Firmware* de controlo do ensaio.
 - *Software* de interação com utilizador.

3.4.2. Sistema de fluídica

O sistema desenvolvido para proceder ao ensaio de modo a ser mais simplificado, não contempla válvulas, câmara de gotas, detetor de bolhas, nem dispensador de líquido, ao contrário do protótipo laboratorial (Figura 3.6)

O ensaio foi desenhado de modo ao utilizador introduzir líquidos de forma sequencial, seguindo as instruções do *software*, deste modo simplifica-se todo o sistema de fluídica, sendo necessário somente um único canal de fluídica entre a introdução das diversas soluções e o reservatório dos líquidos usados, controlado através de uma única bomba.

A primeira aproximação para a miniaturização da bomba consistiu em recorrer a soluções comerciais descritas como indicadas para sistemas de microfluídica, tendo-se optado pelas microbombas da empresa Bartels⁹, modelo mp6, Figura 3.7.

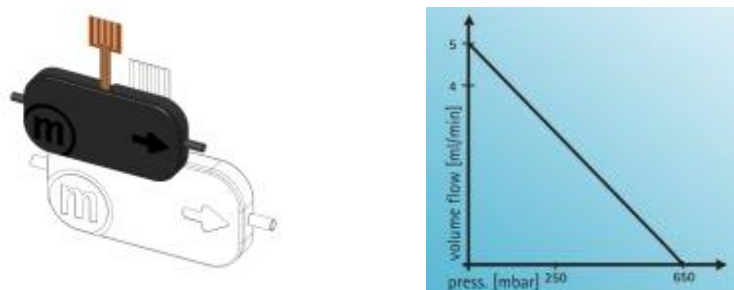


Figura 3.7 – Bomba piezoelétrica da Bartels modelo mp6 e respetivo gráfico de fluxo versus pressão.

Verificou-se que com as estruturas microfluídicas desenvolvidas no Otasens, as bombas não demonstravam capacidade de manter o fluxo constante, e vencer a contrapressão criada por canais de $300 \times 20 \mu\text{m}$. Contudo uma vez que se estruturou o ensaio idealizando a utilização de estruturas microfluídicas em acrílico (PMMA), de modo a ser mais robusto e não maleável, com maior largura de canal ($1000 \times 200 \mu\text{m}$), o sistema foi testado com recurso estas bombas.

O uso regular das bombas demonstrou que após alguns dias de utilização, estas deixavam de ser fiáveis, essencialmente devido a acumulação de pequenas partículas proveniente da passagem de solução no seu interior. Apesar de cumprirem com a sua função enquanto novas (primeiras utilizações) não mostraram robustez necessária para o uso num equipamento pré-industrial.

A inviabilidade do uso de bombas piezoelétricas comerciais levou à procura de outras soluções comerciais. Neste caso o foco dirigiu-se para bombas peristálticas miniatura. Não existem comercialmente muitas opções disponíveis de pequenas dimensões, sendo que os preços exigidos, para as que se conseguiram encontrar, para a gama de fluxos pretendida ($1\text{--}50 \mu\text{L/min}$), serem de tal forma dispendiosas que correspondiam entre um terço a metade do valor final do equipamento. A falta de soluções no mercado fez com que surgisse a necessidade de desenvolver e construir uma bomba peristáltica miniatura, capaz de ser integrada no protótipo pré-industrial.

⁹ <http://www.bartels-mikrotechnik.de/content/view/9/15/lang,english/>

Para o desenvolvimento da minibomba peristáltica, utilizaram-se os recursos existentes no laboratório para o efeito, impressora 3D (formato “Kossel”) e uma máquina de fresa da marca proxxon mf-70 alterada para funcionar com recurso a computador e desenho 3d (CNC).

O conceito passou por converter os desenho e estrutura pré estabelecidos para as bombas peristálticas de tamanho normal mas reduzindo os seus componentes. Para isso desenhou-se uma peça que permitisse acoplar um motor e ao mesmo tempo com a curvatura interior necessária para que o tubo fosse comprimido permitindo criação de fluxo, construiu-se um sistema de pressão circular robusto composto por veios circulares equidistantes em relação ao mesmo centro. A representação da bomba desenvolvida é apresentada na seguinte figura.

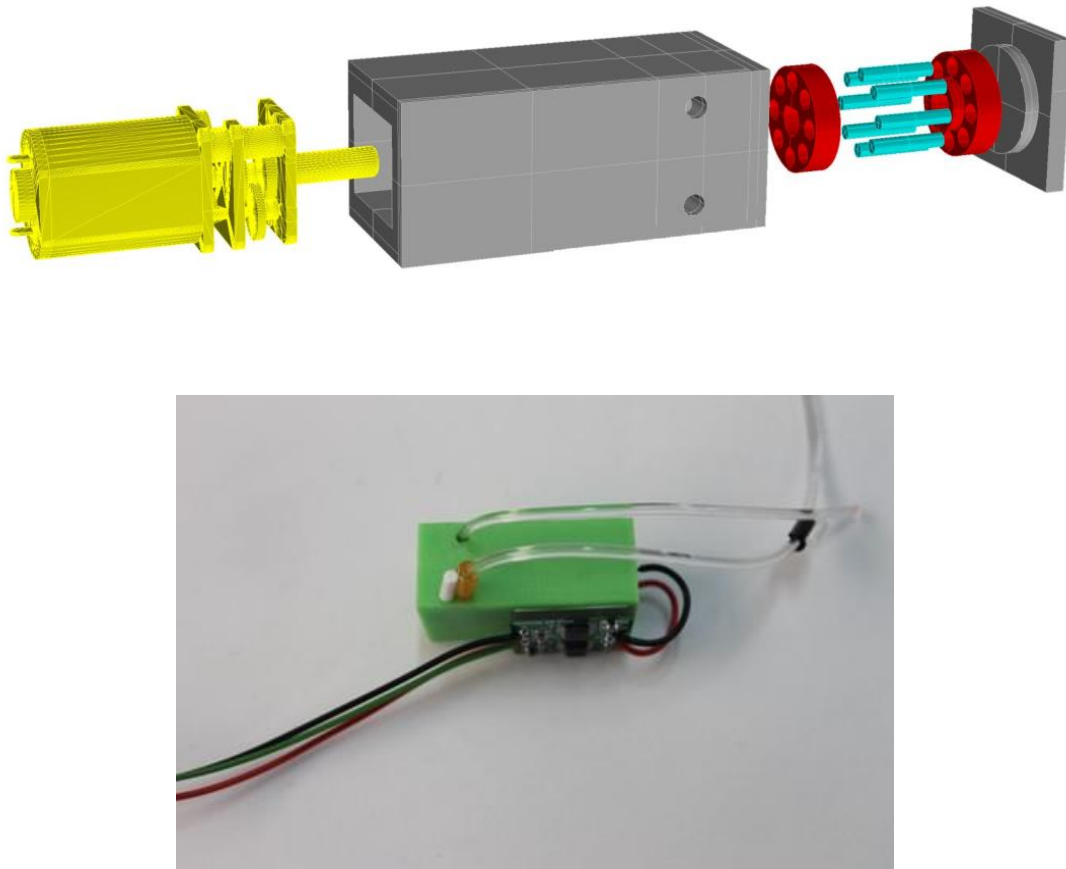


Figura 3.8 – Ilustração em 3D (cima) e fotografia ilustrativa (baixo) da bomba peristáltica desenvolvida ao longo do projeto.

O motor ilustrado a amarelo na Figura 3.8 em cima (motor DC com uma redução de 298:1 da Pololu com rotação máxima de 45 RPM e torque de 40 oz.in quando operados a 6 V) desliza pela cavidade representada na parte esquerda da estrutura principal da bomba (cinza), o veio do motor passa pelo rotor e faz com que o mesmo gire sobre o seu centro. A cinza estão representadas as peças impressas em PLA (ácido polilático, um dos termoplásticos mais utilizados para impressão 3D) a vermelho os rotores em acrílico (PMMA) que foram maquinados com recurso à CNC e a azul

estão representados veios comerciais em ferro, com 2 mm de diâmetro e 8 mm de comprimento.

Efetuuou-se o estudo dos diversos fluxos obtidos na bomba, fazendo circular água e medindo a massa ao final de um determinado tempo. Por *software* controlou-se a voltagem aplicada ao motor, essa alteração é medida numa escala de (0-255¹⁰), a que se deu o nome de velocidade (correspondendo a uma variação de 0 a 45 RPM do rotor), deste modo procedeu-se ao estudo do fluxo em função da velocidade aplicada para diferentes tubos com diâmetro compreendido entre 130 e 650 µm de diâmetro interno. Após o estudo dos fluxos em função do diâmetro interno do tubo, foi escolhido o tubo de diâmetro interno de 190 µm. Este tubo foi escolhido porque permite realizar toda a gama de fluxos pretendida.

A título ilustrativo apresentam-se os valores obtidos para o tubo selecionado na Tabela 3.3 e a respetiva representação gráfica demonstrativa da linearidade entre o fluxo e a velocidade na Figura 3.9.

Tabela 3.3 – Valores de massa e tempo em função da velocidade e respetivo valor de fluxo para tubo de diâmetro interno de 190µm.

Velocidade (0-255)	Massa (g)	Tempo (min)	Fluxo (µl/mn)
75	0.0741	20	3.71
100	0.0404	7	5.77
125	0.0837	10	8.37
150	0.0644	6	10.73
175	0.0652	5	13.04
200	0.0445	3	14.83
255	0.0771	4	19.28

Com os dados provenientes da Tabela 3.3 efetuou-se a representação gráfica da linearidade existente entre o fluxo em µL/min e a velocidade para o tubo de 190 µm de diâmetro interno. Pela observação da Figura 3.9 verificou-se linearidade do fluxo com a velocidade, permitindo um controlo do fluxo com recurso à velocidade imposta por *software* entre 3.7 e 19.2 µL/min.

¹⁰ Uma vez que o microcontrolador que controla a bomba é de 8 bits, e sabendo que o maior inteiro positivo que se pode representar na base 2 (binário) com 8 dígitos é $2^n - 1$ temos $2^8 - 1 = 255$. Desta forma os 5 V com que se controla a bomba podem ser divididos em 255 valores discretos.

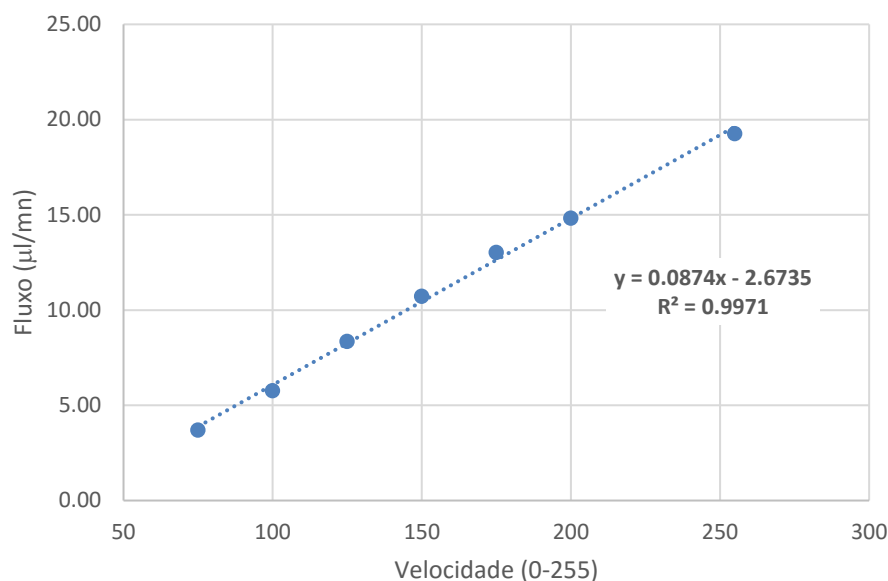


Figura 3.9 – Representação gráfica da curva de calibração do fluxo da bomba em função da velocidade imposta no *software* para o tubo de 190 µm de diâmetro interno.

3.4.3. Sistema de detecção, equipamento e estruturas microfluídicas

Sistema de detecção ótico.

O desenvolvimento de um produto é um processo iterativo, sendo que a decisão sobre a utilização de um determinado componente terá sempre repercussões na escolha dos restantes componentes que interagem com este. Isto é particularmente válido para a seleção do detetor ótico a utilizar o qual não só influenciará o desenho e estrutura do equipamento mas também das estruturas microfluídicas a utilizar.

O sistema de detecção ótica desenvolvido no âmbito do projeto anterior, Otasens, compreendia uma matriz de detetores óticos que permitiam realizar o ensaio com a medição simultânea no canal de referência e de amostra. A diferença existente da resposta entre os diversos detetores da matriz, no protótipo laboratorial, era avaliada expondo os mesmos a uma fonte de luz constante e compensando a diferença entre detetores matematicamente. O sistema de detecção desenvolvido apresenta alguma lacuna quanto à robustez física e de ligação entre os vários componentes, deste modo, e para não estar dependente do desenvolvimento de uma produção de detetores mais robustos com vista a uso em equipamentos pré-industriais, decidiu-se substituir a matriz de fotodíodos de silício, por um único fotodíodo comercial, da Hamamatsu Photonics, modelo (S6428-01).

A utilização deste tipo de detetor apresenta vantagens e desvantagens em relação aos produzidos por medida. Uma grande desvantagem é que a detecção passa a ser efetuada em cada canal isoladamente e não em simultâneo como no caso da matriz de detetores, contudo permite não depender de uma fonte de luz calibrada para avaliar a diferença entre os dois detetores da matriz, uma vez que o detetor usado para a medida é o mesmo para os dois canais. Outra grande vantagem na utilização de

detetores comerciais, é o facto de estes estarem prontos para a utilização em dispositivos comerciais, com maior robustez mecânica em relação aos anteriores. Na figura seguinte são apresentados os diferentes detetores.

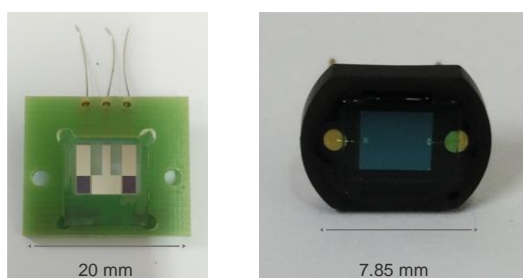


Figura 3.10 – Detetores óticos, à esquerda matriz de fotodíodos fabricado pelo grupo INESC-MN e à direita fotodíodo comercial da Hamamatsu modelo S6428-01.

Tal mudança no sistema de aquisição, leva a que o sistema de microfluídica se adapte à localização espacial do detetor ótico, para facilitar a nível de *design*. Cada ensaio consiste na aquisição de sinal em dois canais distintos, a indicação da existência de contaminação ou não é efetuada por comparação do sinal adquirido para a referência e para a amostra, deste modo optou-se por fabricar uma estrutura microfluídica simétrica, num dos eixos, de modo a que a rotação deste em 180° leve a que ambos os canais estejam posicionados no detetor ótico, como exemplificado na Figura 3.11.

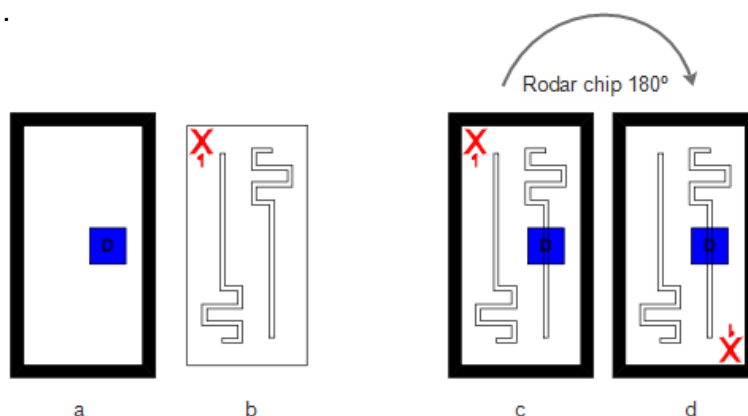


Figura 3.11 – Esquema exemplificativo do mecanismo de funcionamento das estruturas microfluídicas a desenvolver, a) base com detetor e b) estrutura microfluídica simétrica. Na figura c) e d) está exemplificado a rotação da estrutura em 180° permitindo visualizar que ambos os canais se encontram em cima do detetor ótico.

Evolução das estruturas microfluídicas e do design exterior do equipamento.

A estrutura microfluídica desenvolvida e testada no projeto Otasens foi idealizada de modo a demonstrar a viabilidade da metodologia, não contemplando os possíveis constrangimentos da sua aplicação num protótipo pré-industrial e necessidade de ser manipulado por pessoal não familiarizado com o projeto e sem formação científica. Na Figura 3.12 é apresentado à esquerda uma representação esquemática da estrutura microfluídica utilizada anteriormente. A amarelo está representado o PDMS utilizado para selar a estrutura de canais (cinzento), estrutura efetuada recorrendo a moldes de SU-8. Na imagem da direita é possível ver uma estrutura microfluídica real, todo o

PDMS da estrutura é transparente, os canais tem $300 \times 20 \mu\text{m}$ de largura e altura respetivamente, onde foram inseridos tubos de inox nos orifícios de entrada para conferir acesso aos canais, de modo a que um seja o de entrada e o outro de saída de líquido. Para aquisição de luz, o canal a ser utilizado é orientado com o detetor, de modo a estar exatamente por cima do mesmo.

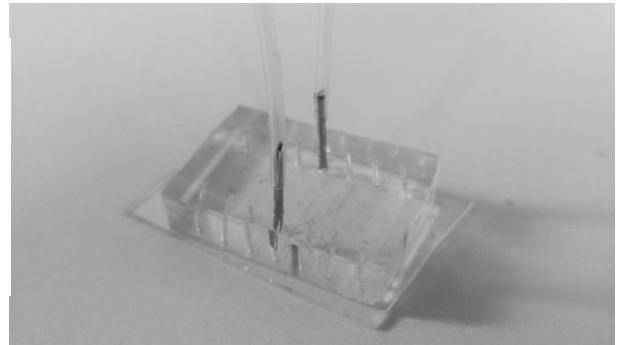
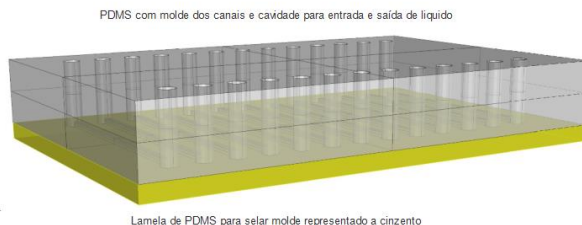


Figura 3.12 – Desenho ilustrativo da composição e formato da estrutura microfluídica utilizada no projeto Otasens e imagem real do mesmo.

O primeiro desenvolvimento tendo em vista a facilidade de uso e robustez da estrutura microfluídica a utilizar, foi efetuado alterando o material de produção de PDMS para acrílico de modo a que a ligação da parte de fluídica se tornasse mais fácil para o utilizador. Sabendo de antemão a necessidade de se verificar quimicamente a reação de adsorção de OTA-BSA e consequentes passos do imunoensaio ocorrem de forma análoga nesta superfície.

Construiu-se um invólucro que permitisse a introdução da estrutura microfluídica e por meio de pressão entre esta e um *o-ring*, localizado na base do equipamento, se garantisse que o sistema ficasse estanque permitindo passagem de líquido e sem possíveis entradas de ar, Figura 3.13.

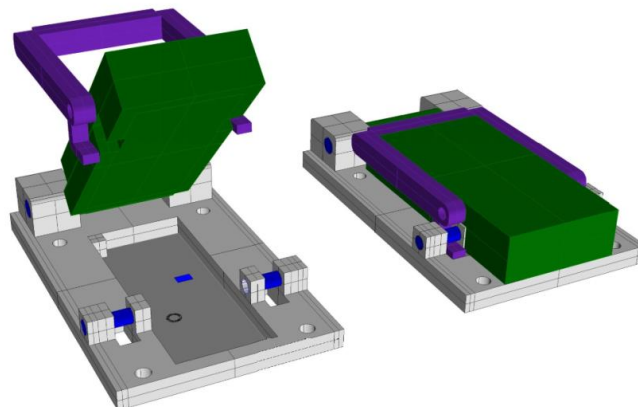


Figura 3.13 – Esquema ilustrativo do mecanismo de pressão para fixar a estrutura microfluídica e conectar ao sistema de fluídica.

A introdução da estrutura microfluídica na peça representada na figura anterior permite que através da pressão exercida quando o mecanismo passa da sua forma apresentada à esquerda para a apresentada à direita, exista uma selagem do sistema

devido à força realizada pela parte superior da peça na estrutura microfluídica contra o *o-ring* da base.

Como descrito anteriormente, a nova estrutura microfluídica deve ser simétrica, de maneira que se realize primeiro o ensaio para o canal de referência e que após rotação de 180 graus, se consiga fazer o ensaio para a amostra sem que para isso nada que esteja na base onde assenta a estrutura microfluídica tenha que ser alterado. A primeira estrutura em PMMA é criada tendo em conta as considerações anteriores e é apresentada na Figura 3.14, onde também é apresentada a primeira versão exterior do equipamento.

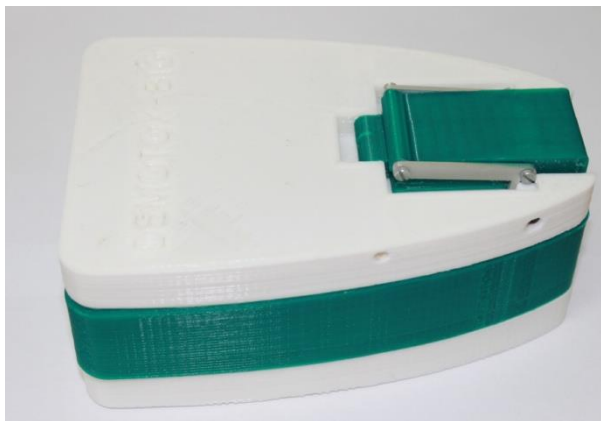


Figura 3.14 – Primeira versão da estrutura microfluídica e do equipamento.

A estrutura microfluídica apresentada na figura é feita em duas camadas de 2 mm cada, de acrílico transparente, a inferior contendo os canais e furos de saída do líquido, e a superior contendo o orifício de entrada de líquido e conexões para auxiliar ao processo de funcionalização da estrutura (introdução dos diversos reagentes necessário à modificação da superfície). A maquinação do acrílico foi realizada recorrendo a um centro de maquinação computadorizada com fresa e broca de 1 mm de diâmetro.

Após alguns testes, verificou-se que a conceção apresentada na Figura 3.14, não funcionava adequadamente. A peça que realiza pressão, montada diretamente na parte impressa em PLA, faz com que seja mais difícil acertar com a força necessária para vedar a estrutura microfluídica ao sistema, ao mesmo tempo que apresentou bastantes zonas de entrada de luz, permitindo que luz chegue ao detetor e assim mascarar o sinal ótico proveniente da reação de quimioluminescência. Uma nova caixa exterior foi redesenhada, de modo a ter o mecanismo de pressão separado da caixa exterior.



Figura 3.15 – Segunda versão do protótipo.

A segunda versão do equipamento, ilustrada na Figura 3.15, não correu como esperado, continuando a permitir a entrada de luz residual para o detetor e para além disso contém um erro de conceção. Verificou-se que entre cada passo de introdução de novas soluções é necessário aliviar a pressão e abrir a caixa, este mecanismo faz com que saia líquido entre a estrutura microfluídica e o *o-ring*, ao mesmo tempo que desgasta o mecanismo devido à constante abertura e fecho do mesmo, pelo menos 6 vezes para cada ensaio.

Um novo equipamento (Figura 3.16) foi conceptualizado e construído eliminando-se zonas de contacto entre a estrutura de pressão e o equipamento, de modo a prevenir a entrada de luz exterior. O sistema de pressão foi alterado, bem como o tipo de entrada para a estrutura microfluídica.

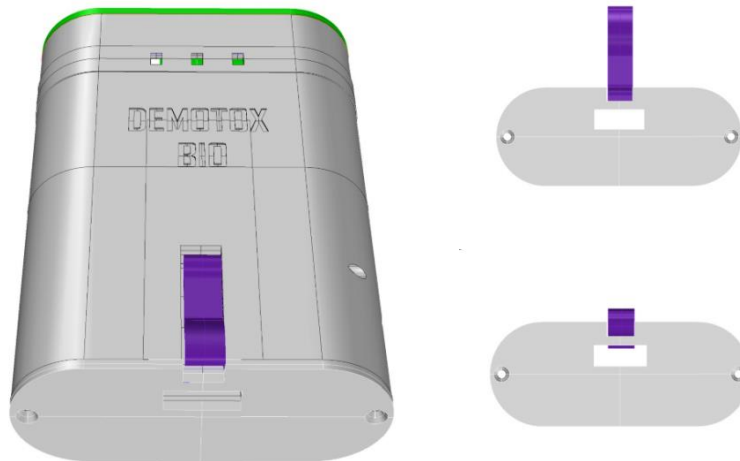


Figura 3.16 – Ilustração da terceira versão do protótipo, e exemplificação do mecanismo de pressão desenvolvido para esta versão.

O método de introdução do chip foi alterado, nesta fase o chip é introduzido na ranhura do equipamento, com a patilha de pressão levantada, quando o utilizador

baixa a patilha representada em cor roxa na Figura 3.16, um veio descentrado faz pressão na estrutura microfluídica, na direção do *o-ring*.

A estrutura microfluídica para esta versão também foi alterada, a placa superior deixou de ser em acrílico cristal para ser de acrílico preto, mais uma vez para minimizar a entrada de luz exterior.

A nova configuração Figura 3.17 permite que a estrutura microfluídica seja introduzida no equipamento e esteja sempre sobre pressão contra o *o-ring*, enquanto a alavanca está para baixo, possibilitando a introdução de soluções durante o ensaio sem a necessidade de remover o chip, colmatando assim o lapso verificado na versão anterior.



Figura 3.17 – Versão nº 3 do protótipo, com as respetivas estruturas microfluídicas.

Após vários ensaios, alterando tempos de imobilização e fluxo, os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que como se apresenta na Figura 3.18 não se conseguiram obter diferenças significativas em quimioluminescência entre um canal modificado com ou sem antígeno (OTA-BSA vs. BSA), verificando-se um valor elevado de adsorção não específica do anticorpo.

Na superfície de PDMS este efeito não era observado, com base nos resultados obtidos no projeto Otasens, podendo-se justificar por duas razões:

1º- Material dos canais, a mudança de PDMS para acrílico pode afetar a cinética de adsorção do antígeno.

2º- Mudança de dimensão dos canais. Inicialmente os canais tinham 300 x 20 µm (largura x altura) e com a mudança para PMMA ficaram com 1000 x 200 µm, estes com área superficial muito superior, sensivelmente 33x.

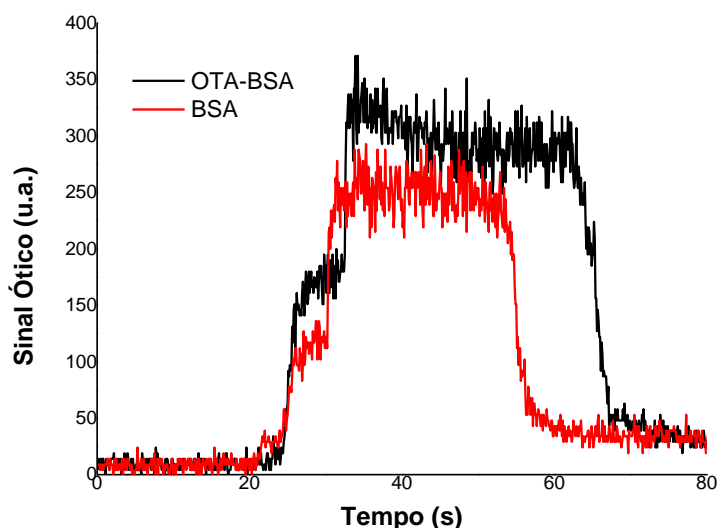


Figura 3.18 – Representação gráfica da quimioluminescência apresentada num imunoensaio efetuado em acrílico com antígeno (OTA-BSA, preto) e na ausência de antígeno mas bloqueado com BSA (vermelho), demonstrando que quase todo o sinal é proveniente de adsorção não específica do anticorpo.

A diferença existente entre o tempo de emissão de quimioluminescência na Figura 3.18 entre os dois ensaios referentes a cada canal é devida a diferenças na quantidade de luminol, proveniente de erro experimental.

A elevada adsorção não específica apresentada na superfície de acrílico, fez com que se optasse pelo PDMS, como material de eleição para a construção dos canais, contudo o tamanho destes não foram mantidos devido à dificuldade de implementar um sistema de bomba peristáltica para manter os fluxos necessários para a imobilização em canais de tão reduzida dimensão. Alterou-se de 300 x 20 para 200 x 100 μm (largura x altura).

De destacar que esta versão da estrutura microfluídica é uma versão mista contendo componentes em PMMA que lhe conferem robustez e componentes em PDMS, onde ocorre processo referente ao imunoensaio.

Desenhou-se a estrutura de canais pretendida, Figura 3.19, e solicitou-se aos nossos parceiros no desenvolvimento do protótipo (INESC-MN) um molde em SU-8 com a estrutura de canais pretendida, de modo a ser usada como molde para fabricação de várias estruturas microfluídicas de teste, a estrutura dos canais é representada na figura seguinte.

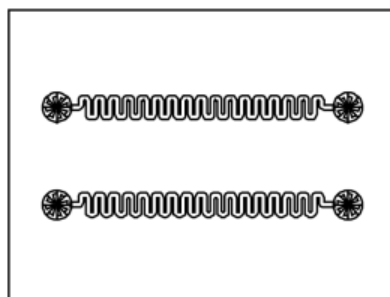


Figura 3.19 – Estrutura de canais efetuada para testar imunoensaios em PDMS.

O uso de canais ($200 \times 100 \mu\text{m}$) em serpentina explica-se por um aumento da área na zona do detetor, aumentando assim o sinal de quimioluminescência em comparação com canais diretos com a mesma largura e altura. A estrutura de PDMS com os canais foi selada com uma película de PDMS e este conjunto selado a uma estrutura de acrílico garantindo assim que todo o canal onde é realizado o imunoensaio é constituído pelo mesmo material (PDMS) e um material rígido de suporte para a conexão com o sistema de fluídica.

O PDMS e acrílico foram selados utilizando uma metodologia reportada na literatura[26][27] para união entre acrílico e compostos terminados em silanos e entre grupos silanos e PDMS. Na Figura 3.20 encontra-se apresentado de forma esquemática, o processo seguido para esta modificação e a respetiva estrutura microfluídica construída na Figura 3.21.

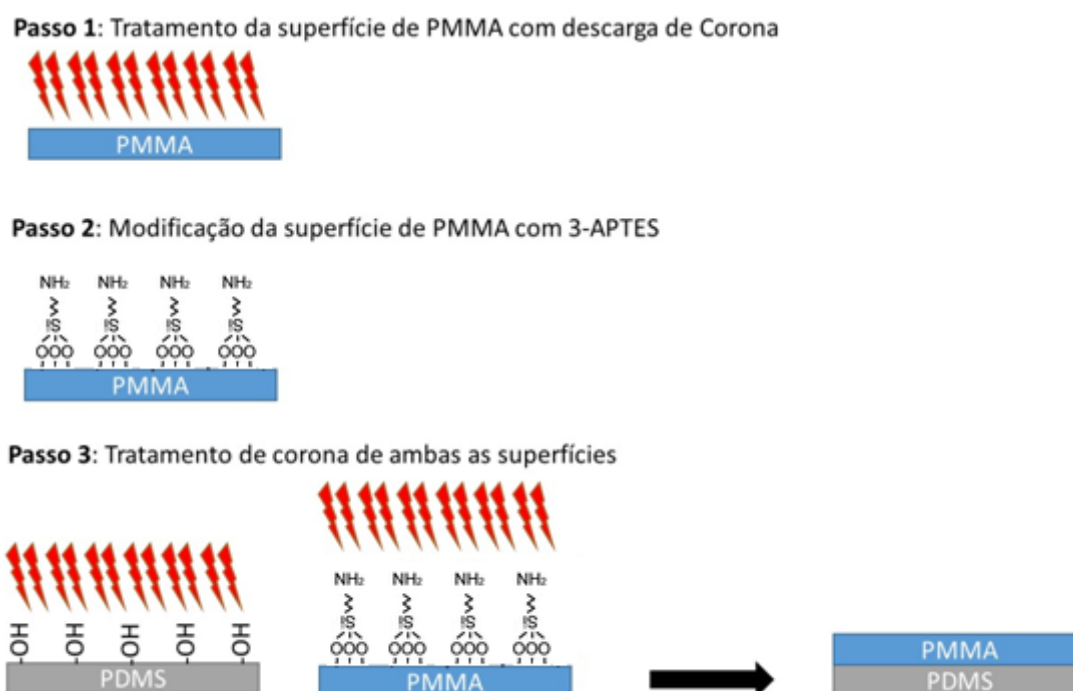


Figura 3.20 – Processo esquematizado para a modificação das superfícies de PMMA e PDMS para ligação covalente.

A metodologia utilizada para união de acrílico e PDMS consiste na exposição de ambas as superfícies a um tratamento de corona (plasma). No processo de tratamento com corona ocorre uma descarga de alta voltagem, os elétrons livres presentes no ar são acelerados colidindo entre si e ionizando-se a gás (plasma), este processo na presença de uma determinada superfície, promove o impacto dos elétrons acelerados com a superfície, estes tem energia superiores às necessárias para quebrar as ligações moleculares em maior parte dos substratos. A quebra de ligações moleculares promove a formação de radicais livres na superfície do substrato bastante reativos que reagem rapidamente com o oxigénio formando vários grupos funcionais. O aumento da energia superficial promove a ligação química entre materiais que contêm oxigénio na sua estrutura e quando tratados por esta técnica.

A estrutura microfluídica resultante da última interação é apresentada na Figura 3.21.



Figura 3.21 – Estrutura microfluídica em acrílico, com área da reação do imunoensaio em PDMS.

A nova estrutura microfluídica contempla um reservatório para as soluções utilizadas, de maneira que as mesmas se mantenham dentro da estrutura descartável, não sendo necessário existir contacto de líquido com a bomba e consequente entrada de soluções para o interior do equipamento onde se localiza a bomba.

De modo a despistar o problema obtido com a adsorção não específica, foram efetuados três ensaios distintos, Figura 3.22, dois onde os canais são modificados com antigénio (OTA-BSA) e um terceiro bloqueado com BSA, nos dois primeiros fez-se variar a concentração de OTA, no primeiro canal usou-se solução não contaminada, enquanto que no segundo solução contaminada com 10 ng/mL de OTA. O ensaio no terceiro canal permitiu verificar que a quantidade adsorvida não especificamente se reduziu drasticamente em comparação com o obtido em acrílico, possibilitando assim a distinção entre a referência e os 10 ng/mL de OTA.

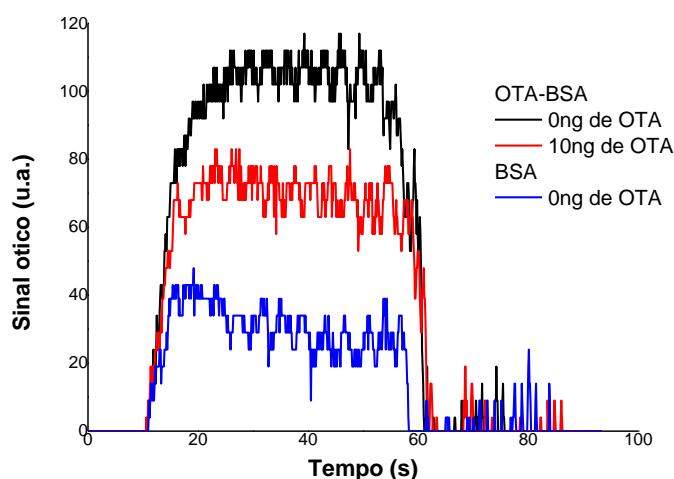


Figura 3.22 – Representação gráfica da aquisição de sinal ótico com o tempo no imunoensaio realizado na superfície de PDMS.

Apesar de ainda se verificar a existência de sinal proveniente de adsorção não específica, nesta fase, espera-se que com otimização do sistema este valor decresça substancialmente. De frisar que este ensaio foi efetuado com a caixa tapada, de modo a não entrar luz exterior, a luz entra pela superfície de chip que fica no exterior do

equipamento e deve conseguir entrar pela placa de PMMA de baixo que é transparente.

A fabricação de um elevado número de estruturas microfluídicas, de modo a efetuar todos os ensaios de otimização do sistema demonstrou ser bastante difícil de realizar, a ligação das 3 placas de PMMA de forma eficiente é bastante complexa e a ligação entre o PDMS e o acrílico mostrou ser eficiente mas bastante trabalhosa.

Na tentativa de conseguir um protótipo isolado da luz, e de simplificar o chip alterou-se o método de introdução do mesmo no equipamento. O chip foi simplificado utilizando-se somente os canais de PDMS selados a uma camada fina de PDMS, e ambos selados a uma peça de acrílico com 2 mm de espessura. Na Figura 3.23 está ilustrado a quarta versão do equipamento na imagem central, o sistema de pressão na parte direita da imagem e a nova versão da estrutura microfluídica na parte inferior da imagem.



Figura 3.23 – Versão 4 do protótipo, chip de microfluídica e respetivo sistema de pressão.

Nesta versão o ensaio é realizado segundo a seguinte sequência:

1. Introdução da estrutura microfluídica na cavidade existente para o efeito.
2. Fazer deslizar a peça que se vai sobrepor ao chip, e rodar o manípulo no sentido dos ponteiros do relógio até bloquear.
3. Introduzir a ponta da pipeta previamente cheia com o líquido pedido pelo *software* no orifício existente no chip, (este passo é feito 3 vezes).
4. Retirar a estrutura microfluídica, rodá-la 180° e repetir tudo para o segundo canal.

Este sistema foi submetido a ensaios fora do laboratório, não com o objetivo de validar resultados obtidos, mas sim com o objetivo de perceber a interação entre os possíveis utilizadores e o protótipo procurando assim ver se o mesmo é de fácil uso para pessoas externas ao projeto.

Com o auxílio deste tipo de interações foi possível apercebermo-nos que o uso da micropipeta da forma que estava pensada, induzia os utilizadores em erro. Utilizadores experientes pipetavam o líquido para dentro do canal, sendo o objetivo deixar a ponta com o líquido presa no chip, utilizadores pouco experientes não tinham conhecimento de como a usar, não diferenciando os dois níveis de pressão existentes na mesma.

Para colmatar este problema, sentiu-se a necessidade de alterar o chip, de modo a que a micropipeta seja utilizada somente com a função que tem, medir quantidades certas de líquido e transferi-los para o sítio pretendido. Para isso construiu-se um chip, com cavidades onde o líquido é introduzido com o auxílio da micropipeta de volume fixo.

Uma das grandes razões para o uso de camada inferior da estrutura microfluídica em acrílico, era garantir que existia uma boa união entre o *o-ring* da base e a superfície de acrílico, garantindo assim um controlo eficiente do fluxo de líquido. Contudo depois de verificar a dificuldade de produção associada ao uso do acrílico, foi desenvolvida uma maneira de selar o chip e microfluídica utilizando a elasticidade inerente ao PDMS. Ilustrado na Figura 3.24.

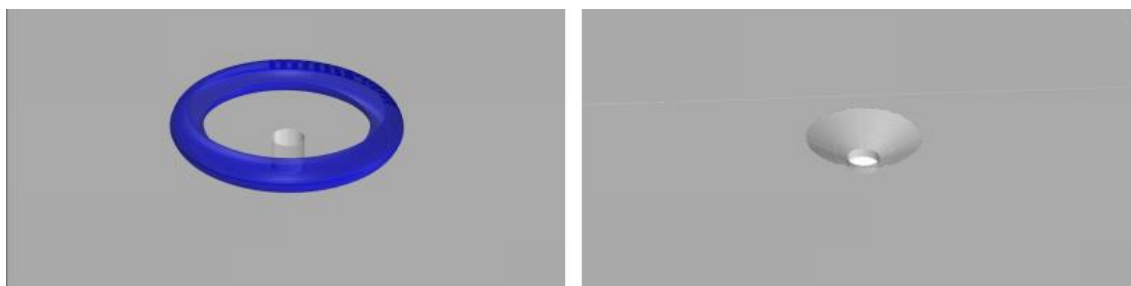


Figura 3.24 – Ilustração da base utilizada para selar as estruturas microfluídicas de acrílico (esquerda) e da usada para selar as estruturas microfluídicas de PDMS (direita).

A evolução passou de uma base do equipamento com um *o-ring*, onde era pressionada uma superfície rígida (acrílico) selando o sistema de fluídica e a estrutura microfluídica (imagem da esquerda Figura 3.24), para uma cavidade cónica onde a superfície maleável de PDMS é pressionada moldando-se à base, permitindo assim que o sistema fique estanque (imagem da direita Figura 3.24).

A estrutura microfluídica em PDMS é constituído por 3 camadas, Figura 3.25, uma superior com os reservatórios de depósito de líquido, a intermédia com os canais em

relevo negativo e uma inferior com os orifícios respetivos para a ligação ao sistema de fluídica.

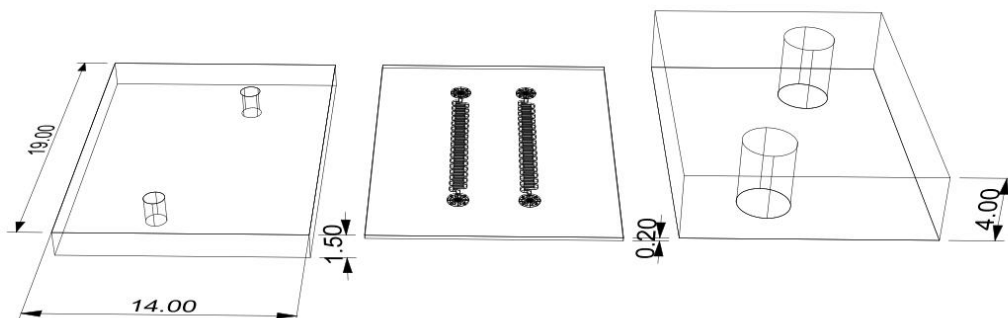


Figura 3.25 – Ilustração e medidas em milímetros dos constituintes do chip final de microfluídica em PDMS, da esquerda para a direita é apresentada a estrutura referente ao chip visto da base até ao topo.

O fabrico do chip final utilizado no protótipo requer a preparação das 3 camadas que o compõem em separado e mais um passo de união de todas as camadas. As ilustrações seguintes mostram o processo de fabrico de cada camada, começando pela camada representada à esquerda na Figura 3.25, que representa a base do chip, seguido da camada com os canais e da camada superior do chip que é apresentada à direita da mesma figura.

Os moldes efetuados à exceção do molde em silício com os canais em SU-8, foram feitos no laboratório, em acrílico e recorrendo ao centro de maquinaria computadorizado.

Base inferior do chip.

A Figura 3.26 esquematiza o procedimento de fabrico da camada da base, começando por demonstrar o molde utilizado para o fabrico das peças, no qual é efetuado o enchimento com PDMS e curado durante 60 minutos a 75°C, depois de desenformado, recorrendo a uma peça de PMMA com o tamanho do chip, procede-se ao corte e furação do PDMS como pretendido. Este molde garante que a distância entre os canais e o detetor é sempre a mesma, crucial para a reprodutibilidade do sistema, pois a altura da peça é fixa.

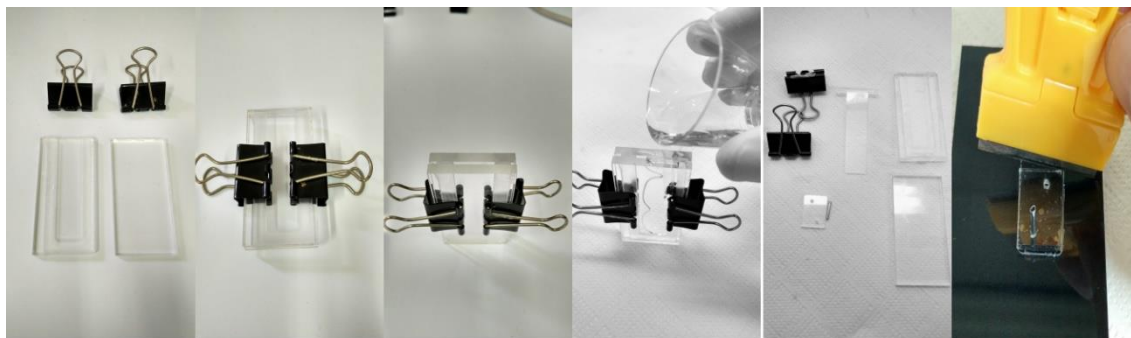


Figura 3.26 – Ilustração esquemática do fabrico da camada da base da estrutura microfluídica.

Camada intermédia, canais.

Um molde de silício com os canais em relevo em SU-8 com 200 μm de largura e 100 μm de altura é colocado numa caixa de *petri* e preenchido com PDMS, após cura é retirada a parte de PDMS que tapa os canais, como ilustrado na Figura 3.27. Após o molde estar preparado, é vertido 1 grama de PDMS em cima da área dos canais e o molde é deixado em repouso, numa superfície horizontal, de modo a que todo o silicone se distribua de forma uniforme, a cura é de 60 minutos a 75°C. A camada de PDMS depois de curada, é retirada do molde, cortada e são feitos os furos necessários com o auxílio da peça de PMMA previamente preparada para o efeito.

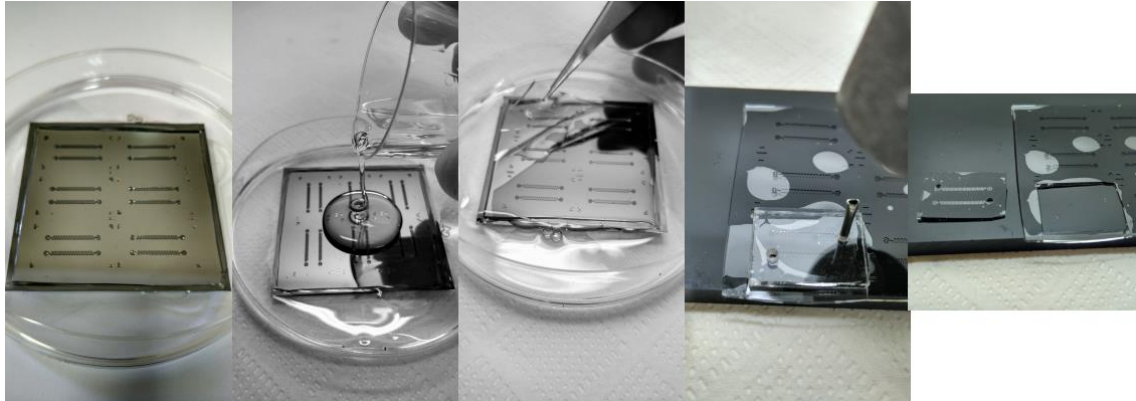


Figura 3.27 – Ilustração esquemática do fabrico da camada com canais do chip de microfluídica.

Base superior da estrutura microfluídica, PDMS preto.

O processo de fabrico é ilustrado na Figura 3.28. Os moldes foram construídos de modo a que a introdução de pontas de pipetas nos buracos deixados nos moldes para o efeito, criasse um cone no modelo que irá servir como reservatório de líquidos. O molde é atestado com PDMS preto, preparado de igual forma aos anteriores mas adicionando 50 μL por grama de tinta-da-china. O tempo de cura passou de 60 minutos para 90 minutos a 75°C. Após a cura efetuada retira-se o PDMS do molde e corta-se à medida com auxílio de uma peça para o efeito.

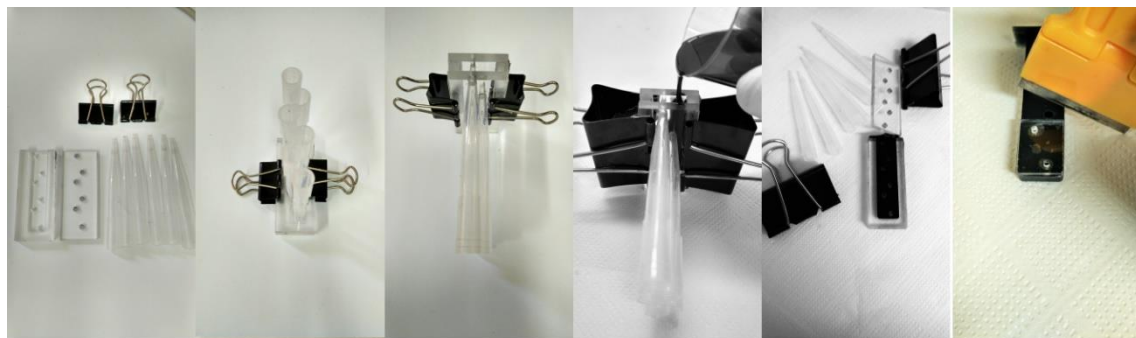


Figura 3.28 – Ilustração esquemática fabrico da camada negra do chip (camada superior) de microfluídica.

Após o fabrico de todos os constituintes do chip em separado, a união das várias camadas é efetuada recorrendo ao uso de um equipamento de tratamento por corona, este equipamento aplica descargas elétricas na superfície do PDMS modificando a

sua superfície e permitindo que o mesmo ligue covalentemente a outra camada de PDMS de forma irreversível. É aplicado tratamento de corona nas camadas da base e dos canais, durante aproximadamente 40 segundos, a camada dos canais é selada em cima da base e exposta novamente à técnica de corona durante 40 segundos. Desta feita a camada superior é selada contra a camada do meio e o chip é posto na estufa a 75°C durante 10 minutos de modo a estabilizar as ligações efetuadas e tornar a ligação entre as várias camadas de PDMS irreversível, a ordem das operações é ilustrada na Figura 3.29.

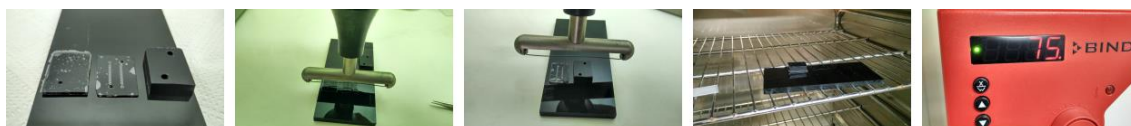


Figura 3.29 – Montagem das várias camadas do chip para a formação do chip final.

Na Figura 3.30 encontra-se finalmente representado a versão final do protótipo construído com a respetiva identificação de todos os elementos que o compõem.

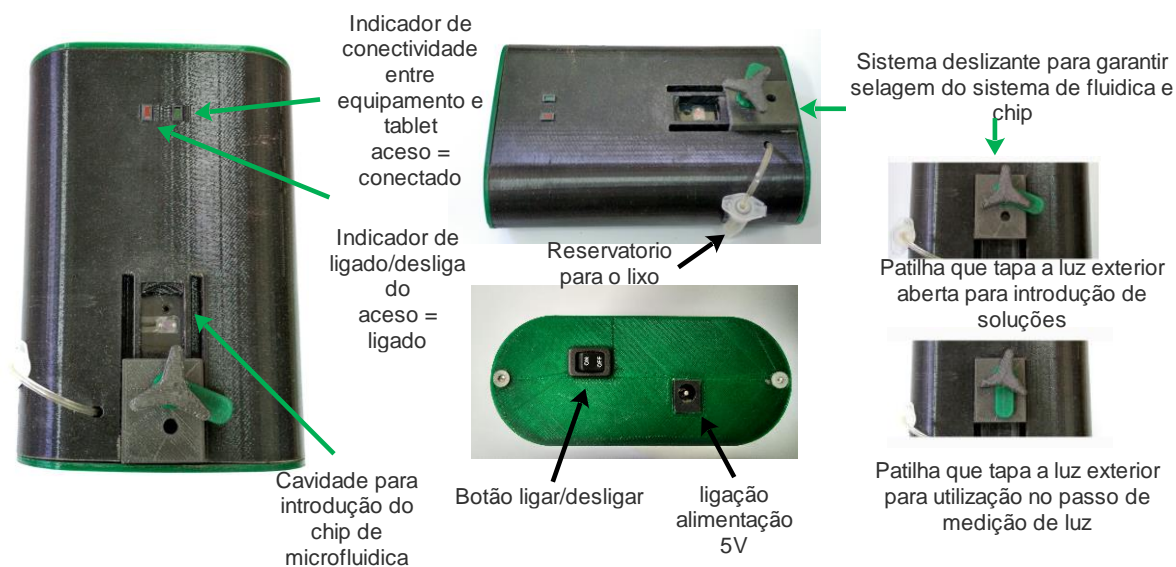


Figura 3.30 – Protótipo final desenvolvido ao longo do projeto Demotox.

3.4.4. Placa eletrônica de controlo

A placa eletrônica utilizada para controlar os sensores óticos no projeto Otasens é ilustrada na Figura 3.31.

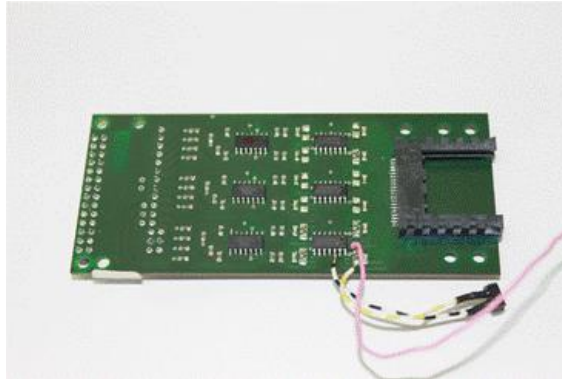


Figura 3.31 – Placa eletrônica proveniente do Otasens.

O intuito de desenvolver um equipamento sem visor e com uma aplicação para ser utilizada num *tablet* que acompanha o equipamento ou com a possibilidade de ser utilizado por qualquer dispositivo *android* para controlar o equipamento fez com que a primeira versão da placa eletrônica do Demotox incluísse um módulo *bluetooth* de modo a garantir a comunicação entre o dispositivo e o que o controla.

A primeira placa, Figura 3.32, foi desenvolvida tendo em conta a sua ligação a um módulo *bluetooth* existente no mercado, escudo *bluetooth*, acoplado a um *Arduino® Uno*. Esta versão teve como finalidade realizar um teste rápido do conceito entre os vários módulos que o compõem.

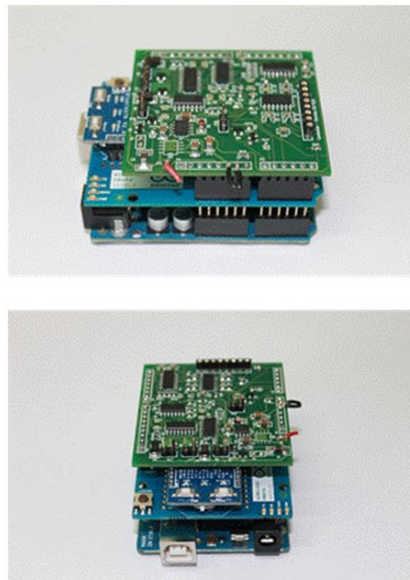


Figura 3.32 – Fotografia ilustrativa da 1ª versão da placa desenvolvida para o Demotox em diferentes vistas. O diagrama esquemático e imagem 3D referente a esta versão encontra-se na seção anexos (Anexos 1 a 3).

A 1ª versão da placa eletrónica desenvolvida controla os seguintes periféricos:

- 1 Bomba piezoelétrica
- 2 Detetores óticos

A placa recolhe o sinal de saída analógico dos detetores óticos em 4 canais distintos, dois deles recebem o sinal analógico direto e outros dois efetuam a integração analógica do sinal em função do tempo, deste modo é possível utilizar os dois tipos de aquisição de sinal para cada detetor. O controlo do tempo de integração é efetuado via programação do microprocessador.

Na versão seguinte, ilustrada na Figura 3.33, efetuou-se a compilação de todos os constituintes da versão anterior numa placa só. Nesta versão também se alterou o circuito de controlo e aquisição de sinal dos detetores bem como se incluiu um microprocessador *Atmega 328p*, um módulo *bluetooth*, módulo de alimentação, porta *usb* para permitir modificações no *firmware* e um módulo de controlo da bomba piezoelétrica.

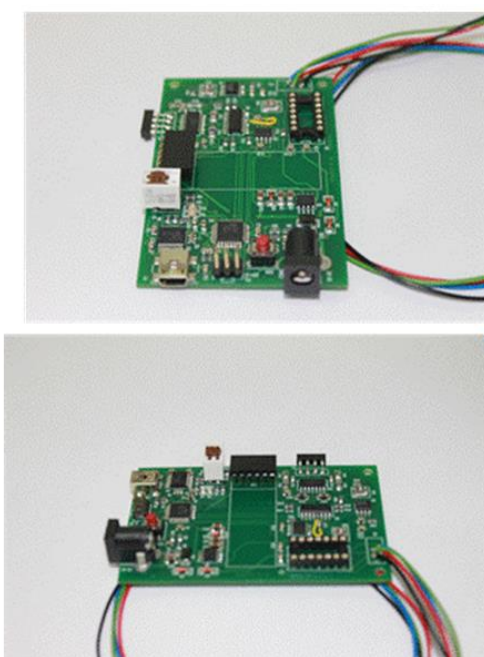


Figura 3.33 – Fotografia ilustrativa da 2ª versão da placa desenvolvida para o Demotox em diferentes vistas. O diagrama esquemático e imagem 3D referente a esta versão encontra-se na seção anexos (Anexos 4 a 7).

A última versão da placa de circuito impresso, Figura 3.34, foi produzida de modo a permitir determinadas mudanças:

- Inclusão de 3 LEDs controlados pelo microprocessador. Um para indicar se o equipamento está ligado ou desligado (cor vermelha), outro para indicar se o equipamento está ocupado a realizar alguma operação (verde) e outro para informar a conectividade *bluetooth* (azul) foi estabelecida.
- Inclusão de botão de equipamento ligado/desligado.
- Separação do circuito responsável pela aquisição de dados, da placa mãe de controlo, de modo a obter medidas com menos interferências elétricas.

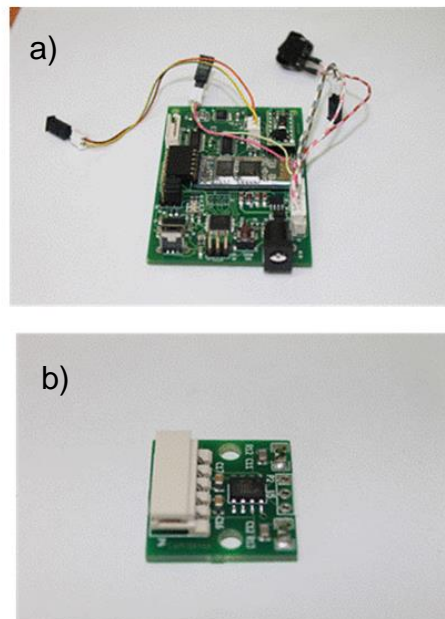


Figura 3.34 – Fotografia ilustrativa da 3ª versão da placa desenvolvida para o Demotox (a) e fotografia da placa de aquisição de dados (b). Os respectivos diagramas esquemáticos e imagens 3D referentes a esta versão encontram-se na seção anexos (Anexos 8 a 11).

Para a aquisição do sinal dos detetores óticos é necessário um circuito de transimpedância com grande amplificação de sinal, neste caso de 1 Giga, o que faz com que exista uma grande suscetibilidade do sinal a ruído elétrico, por este motivo é que se decidiu separar o circuito de aquisição ótica dos restantes circuitos. De modo a minimizar também interferentes externos, o interior do equipamento foi pintado com uma tinta condutora de modo simular o efeito de uma caixa de faraday.

3.4.5. *Firmware* de controlo e de interpretação de dados

O desenvolvimento do *firmware* de controlo efetuou-se recorrendo ao Ambiente Integrado do Desenvolvimento (IDE, Integrated Development Environment) já existente para o microcontrolador de Arduino.

O Arduino é uma plataforma de *hardware* livre, projetado com um microcontrolador Atmel AVR. É uma placa de código aberto baseado num circuito com pinos de entradas/saídas (I/O) simples, micro controlada e desenvolvida sobre uma biblioteca que simplifica a escrita da programação em C/C++. A linguagem do Arduino usa uma syntax em java, mas o código fonte e respetivas bibliotecas são escritas numa versão de C/C++.

Um ficheiro em arduino e respetivo código pode ser decomposto em cinco elementos principais:

- **As bibliotecas**, que vêm no início do programa, e onde são incluídas todas as bibliotecas as quais são normalmente constituídas por funções pré-feitas por outros programadores ou até mesmo pelos criadores da plataforma Arduino.

- **As Variáveis**, as quais são definidas após as livrarias, servindo para guardar informações, como por exemplo o valor de uma velocidade, o resultado de um cálculo.

- **As funções**, dizem respeito a funções criadas pelo programador e não às incluídas nas bibliotecas

- **void setup()**, Esta função apenas é executada uma vez e é normalmente utilizada para executar a inicialização de variáveis, a inicialização da utilização bibliotecas, a definição dos pinos (como input ou output), o início do uso de comunicação série, entre outros.

- **void loop()**, Esta função faz um “loop” sucessivo (como o próprio nome indica), ou seja, todos os comandos existentes no interior desta função são sucessivamente repetidos, o que pode permitir a leitura sucessiva de portas, a leitura sucessiva de parâmetros provenientes de sensores externos e atuar de acordo com as condições estabelecidas, entre muitas outras aplicações.

As funções “*void setup()*” e “*void loop()*” são de carácter obrigatório, ou seja, mesmo que não seja necessária a sua utilização deverão constar no código utilizado. E apenas serão chamadas funções externas que constem na função “*void loop()*”.

Os microcontroladores utilizados até ao momento, nos modelos disponíveis da plataforma de desenvolvimento *Arduino*, possuem conversores A/D com 10 bits de resolução (informação retirada do datasheet dos respectivos microcontroladores), ou seja, uma entrada analógica cujo valor varia entre 0 V e 5 V, terá a sua correspondência em binário a valores entre 0 (0000000000) e 1023 (1111111111) respetivamente. O que permite atingir resoluções, na ordem dos 5 mV.

O controlo do equipamento desenvolvido é realizado por recurso a dois módulos distintos de *software* que comunicam entre si: um *firmware* que corre no microcontrolador presente na placa mãe e um módulo escrito em java que corre no dispositivo *android* de controlo.

Apenas o primeiro módulo foi escrito no âmbito deste doutoramento tendo sido a aplicação em *android* efetuada recorrendo a um programador externo, subcontratado. Assim sendo os detalhes relativos ao *software* serão dados apenas referentes ao primeiro módulo.

Apresenta-se ilustrado na Figura 3.35 o fluxograma relacionado ao *firmware* acima mencionado.

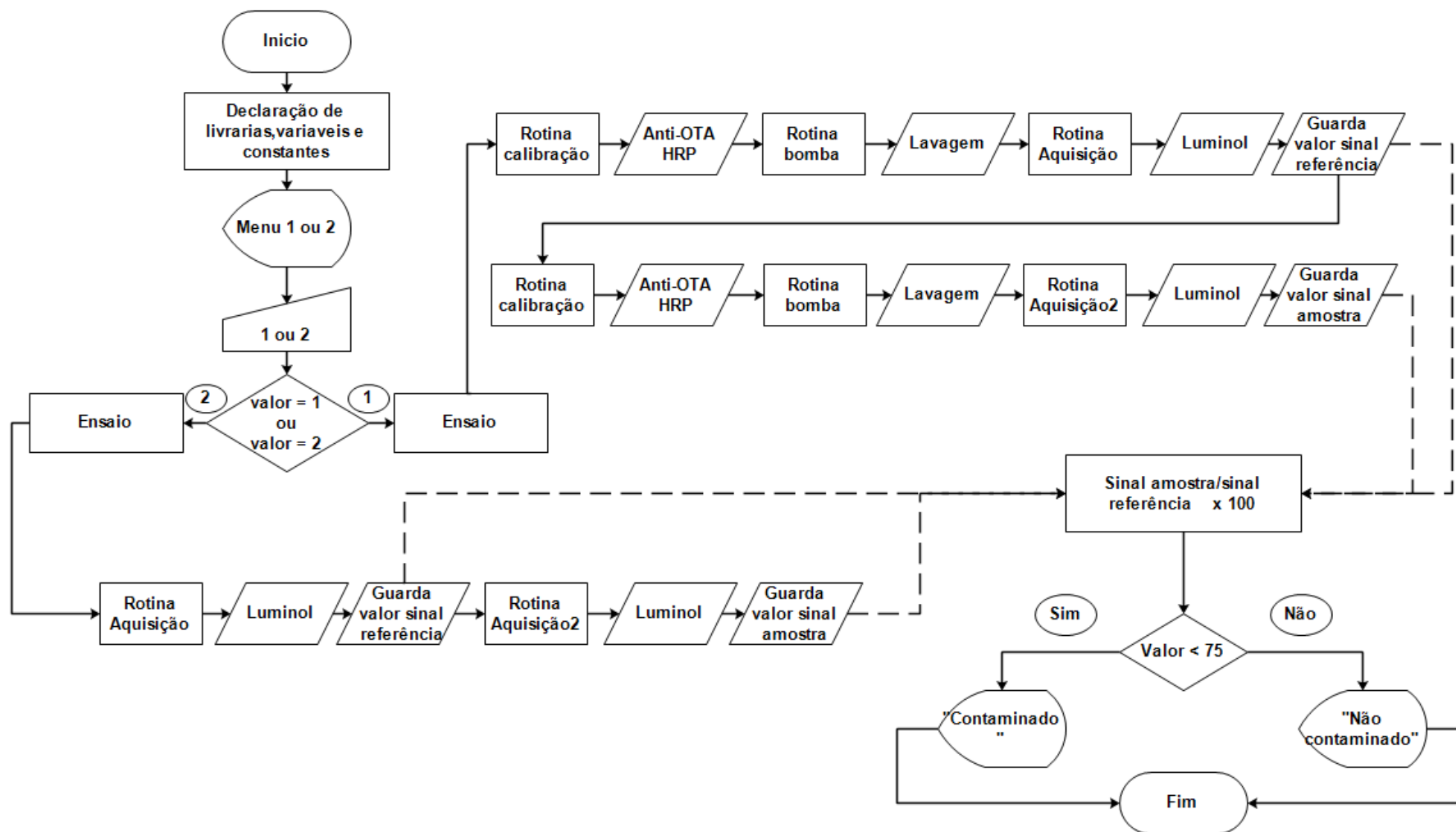


Figura 3.35 – Fluxograma ilustrativo do funcionamento do programa desenvolvido de modo a efetuar a aquisição de sinal.

O programa começa com as declarações das bibliotecas, variáveis e constantes que serão utilizadas. Inicialmente o programa foi pensado somente para ter um percurso, esquematizado pelo seguimento do numero 1 da Figura 3.35, contudo com a experiência adquirida na elaboração de ensaios no laboratório, verificou-se a necessidade de ter um menu de escolha para somente realizar o ensaio de quimioluminescência, de modo a poder ter ensaios preparados exteriormente ao equipamento mas analisados no mesmo, ou mesmo para repetir somente a aquisição de luz devido a algum problema no primeiro ensaio.

O menu criado para dar a possibilidade abordada anteriormente entre proceder ao ensaio completo ou somente a aquisição de quimioluminescência é apresentado na Figura 3.36.

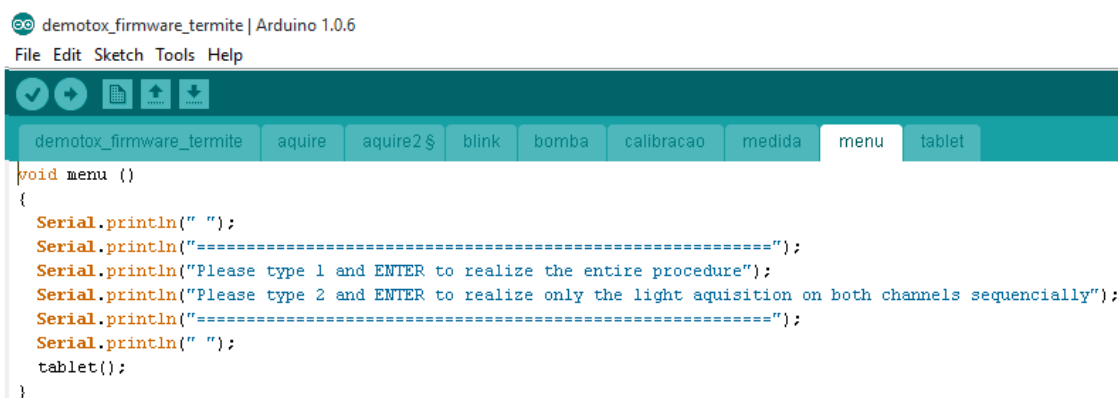


Figura 3.36 – Ilustração da rotina menu, que é apresentada na versão do programa com o computador como interface.

Antes e após cada ensaio este menu aparece no visor de modo ao utilizador escolher que tipo de ensaio pretende realizar. Existe uma rotina (*void loop()*) que está constantemente a analisar o número que o utilizador seleciona e faz com que o código tome a decisão de seguir um ou outro percurso.

Escolhendo a opção 1, o programa corre o ensaio por completo, contemplando todos os passos, imobilização de anticorpo, lavagem e aquisição de luz para ambos os canais. Nesta escolha, o programa efetua a rotina “*calibração*” referente ao canal de referência, seguido da rotina “*medida*” referente ao canal de amostra. As duas rotinas são praticamente iguais, na figura seguinte é apresentado somente a rotina “*calibração*”.

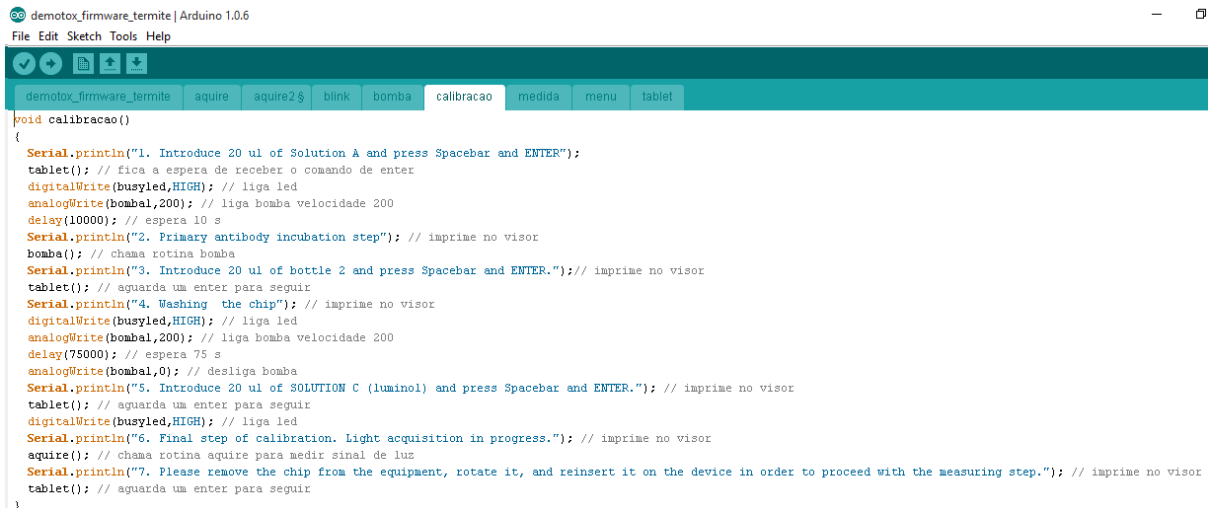


Figura 3.37 – Ilustração da rotina calibração.

Na Figura 3.37 é apresentada a rotina de calibração que é idêntica à rotina “*medida*”, funciona da seguinte forma, informa a quantidade de liquido a introduzir e espera um *ok* (entrada de qualquer carater) da parte do utilizador, após o *ok* acende o *led* do equipamento para informar que algo está em curso, liga a bomba durante 10 segundos e chama a rotina “*bomba*”, ilustrada na Figura 3.38 que permite fazer a imobilização da mistura de anticorpo e analito (SUA) de modo mais lento.



Figura 3.38 – Esquema da rotina de controlo da bomba para a imobilização da SUA.

A rotina “*bomba*” faz 40 ciclos de 4.25 segundos ligado a velocidade baixa (25) e 4 segundos desligada, perfazendo um total de tempo de 330 s. Finalizados os 40 ciclos liga a bomba a velocidade máxima durante 20s de modo a garantir que toda a solução de SUA passe pelo canal e que o mesmo fique vazio, terminado a rotina “*bomba*”, volta para a que lhe deu origem e apresenta uma mensagem ao utilizador para introduzir a solução de lavagem e aguarda um *ok*. Liga a bomba durante 75 segundos, informa no visor o passo em que está e volta a pedir novo comando ao utilizador, para introduzir a solução do passo de aquisição de luz, e aguarda comando, Figura 3.39. Com o *ok* após a introdução de líquido o programa é direcionado para a rotina “*aquire*” onde é feita a medição de luz.



```

demotox_firmware_termite | Arduino 1.0.6
File Edit Sketch Tools Help

demotox_firmware_termite aquire aquire2$ blink bomba calibracao medida menu tablet

void aquire()
{
  sinalref=0;
  total=0;
  int total2=0; // garantir que valores iniciam em zero
  //-----
  analogWrite(bomba1,200); // ligar a bomba velocidade 200
  // *****MEDIDA*****
  Serial.print("Time (s)");
  Serial.print("\t");
  Serial.println("Signal");
  int c=1; // variavel c começa em 1
  total2=1; // variavel total2 começa em 1
  while (c < 27) // c varia de 1 a 27 , contas feitas para o ensaio ter 135 s
  {
    for (int i=((50*c)-50); i<50*c; i++) // Ideia do ensaio é medir segmentos de 5s fazer a media e
    { // verificar se a média é superior ou nao à anterior
      Serial.print(i*0.1); // com o proposito de apresentar o máximo no final do ensaio
      Serial.print("\t");
      int signal= analogRead(A1);
      Serial.println(signal); // no caso do uso do pc os pontos são escrito no monitor
      delay(100);
      total=total + signal; // soma todos os pontos de 0.1s em 0.1s
    }
    total=total/50; // faz a média, divide o valor total dos 5 segundos pelo numero de pontos
    if (total>total2)
    {
      total2=total; // na variavel total fica guardado a média maior
    }
    c=c+1;
    total=0; // valor de total igual a zero, para utilizar a variavel nas contas da media
  }
  sinalref=total2; // guarda média máxima ao longo do ensaio em sinalref
  analogWrite(bomba1,0); // desligar a bomba
}

```

Figura 3.39 – Rotina de aquisição de luz.

Ilustrado na figura anterior, a rotina de aquisição de luz ocorre da seguinte forma: as variáveis são postas a zero e efetuam-se 27 ciclos de 5 segundos, em cada um deles o código analisa o valor e compara com o anterior e guarda o mais alto, ao mesmo tempo que manda todos os valores para o visor possibilitando o uso dos mesmos com recurso a uma folha de cálculo, no final do ensaio é apresentada a maior média obtida em intervalos de 5 segundos. A aquisição fazendo média dos 50 pontos (5s) tem como finalidade eliminar possíveis interferências sem sentido existentes na aquisição. O sinal de referência é guardado e segue-se a rotina que efetua o canal da amostra que em tudo é igual à de referência guardando o sinal da amostra.

Após guardados os dois sinais obtidos, o código faz o cálculo do valor a apresentar, verifica-se a razão entre o sinal de referência e da amostra está acima ou abaixo de 75% (este valor sofreu alterações com a otimização de resultados e dependendo do ensaio pretendido) e apresenta a contaminação ou não contaminação da amostra em causa, Figura 3.40.

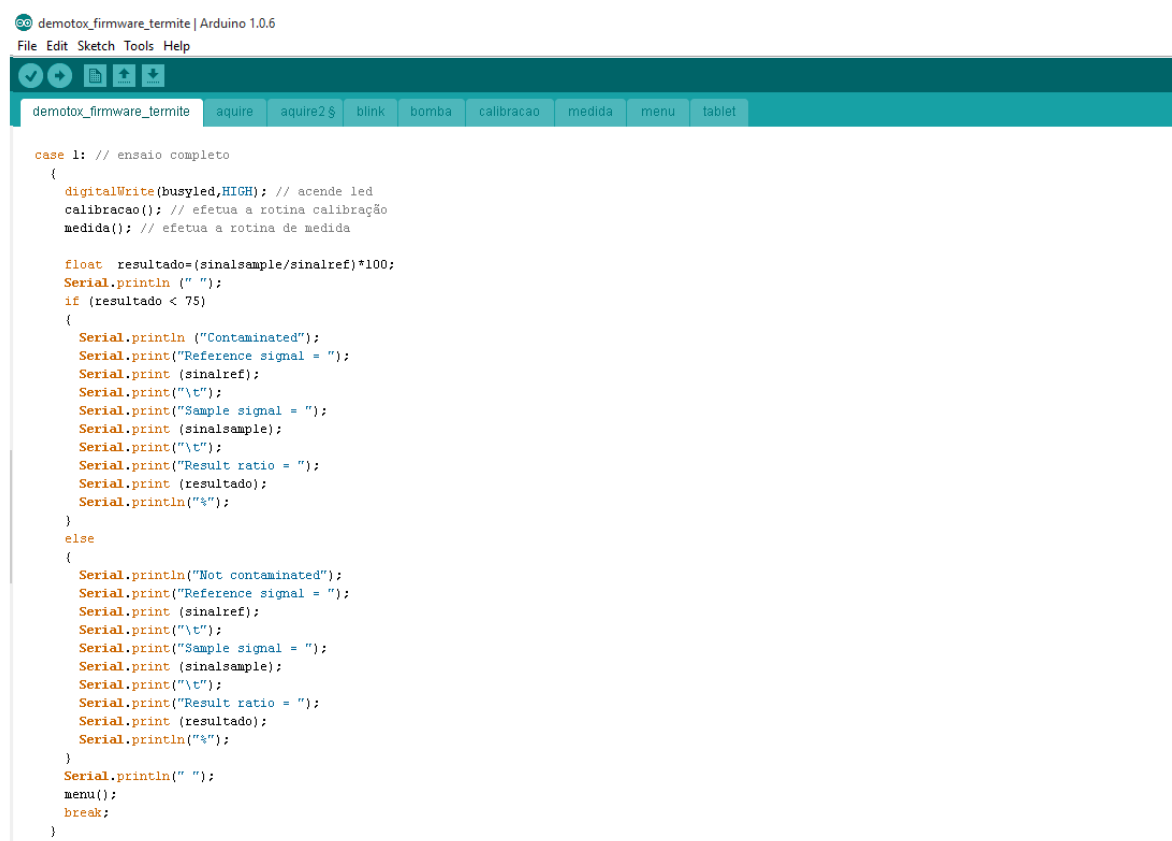


Figura 3.40 – Caso 1 do menu onde se verifica a fórmula de cálculo para a possível contaminação.

O programa de aquisição construído e descrito anteriormente permitiu todo o desenvolvimento da parte de ensaio em laboratório e a sua integração com a aplicação android desenvolvida por um programador externo permitindo obter uma plataforma simples e intuitiva para o utilizador. Em seguida, Figura 3.41, são apresentadas as imagens do visor captadas no *tablet* após o desenvolvimento completo de modo a dar a perceção ao leitor do processo envolvido na realização de um ensaio.



Figura 3.41 – Interface final entre o utilizador e o protótipo final do projeto Demotox.

3.4.6. Reformulação do formato do imunoensaio

O ensaio original proveniente do projeto Otasens, como mencionado na introdução, consiste num imunoensaio competitivo indireto em solução, onde a superfície de PDMS é modificada através de adsorção física com OTA-BSA e as moléculas de analito (OTA) em solução competem com as moléculas de OTA imobilizada na superfície do canal pelo anticorpo (anti-OTA).

Uma maior concentração de OTA na amostra leva a que exista menor quantidade de anti-OTA livre para se ligar à OTA imobilizada à superfície, com consequente decréscimo de ligação do anticorpo secundário à anti-OTA verificando-se também decréscimo de sinal ótico.

Os tempos de ensaio reportado no final do projeto anterior são reportados na seguinte tabela:

Tabela 3.4 – Tabela ilustrativa do tempo despendido em cada passo do imunoensaio no Otasens.

Passo	Tempo (min)	Notas
Incubação de Amostra com anti-OTA IgG (SUA)	180	Incubação prévia, não será contabilizada como tempo de ensaio
Imobilização OTA-BSA	10	Superfície modificada antes da entrega ao cliente, não conta tempo de ensaio
Lavagem	3	
Fluxo de SUA	15	
Lavagem	3	
Fluxo de Anti- <i>Rabbit</i> IgG HRP	10	Tempo total ensaio de 33 minutos
Lavagem	3	
Fluxo de Luminol	2	

Apesar do tempo de incubação entre a amostra e o anticorpo não contar para o tempo de ensaio, é necessário a preparação da mistura 3 horas antes de ser efetuado o ensaio, o que representa uma grande desvantagem quando se pretende um dispositivo de resposta rápida.

Tendo em vista o desenvolvimento de um protótipo comercial, um dos desafios apresentados é a diminuição do tempo de ensaio e de rapidez de resposta. Com tempo de resposta de 33 minutos e preparação prévia de 3 horas limita-se o mercado de interesse, apresentando uma solução viável para determinadas operações que não tem como tempo de análise o principal facto de escolha, mas exclui-se os possíveis interessados que pretendem uma resposta rápida de modo a por exemplo aceitar ou devolver determinada matéria-prima.

Com o intuito de acrescentar valor ao produto, efetuaram-se mudanças no tipo de ensaio de modo a que o tempo de ensaio fosse reduzido.

A principal mudança envolveu o uso de um anticorpo contra a OTA já marcado com HRP, deste modo passou-se de um imunoensaio competitivo indireto para um ensaio competitivo direto com o antígeno imobilizado. Eliminando o passo de imobilização de anticorpo secundário, observando-se diretamente um decréscimo de 13 minutos no total de ensaio. O anticorpo primário marcado serviu como substrato para a reação com luminol e consequente aquisição de luz.

Na Figura 3.42 apresenta-se uma imagem ilustrativa do desenvolvimento efetuado a nível de imunoensaio entre o Otasens e o Demotox.

No ensaio proveniente do Otasens ficou reportado o uso de 3 horas como tempo de incubação, não tendo encontrado nenhuma explicação para o fato, a verdade é que após estudo do imunoensaio desenvolvido neste projeto com o anti-OTA-HRP foi avaliado o tempo de incubação necessário para a obtenção de bons resultados verificando-se que a reação é instantânea bastando o tempo de preparação dos reagentes para a obtenção de resultados estáveis.

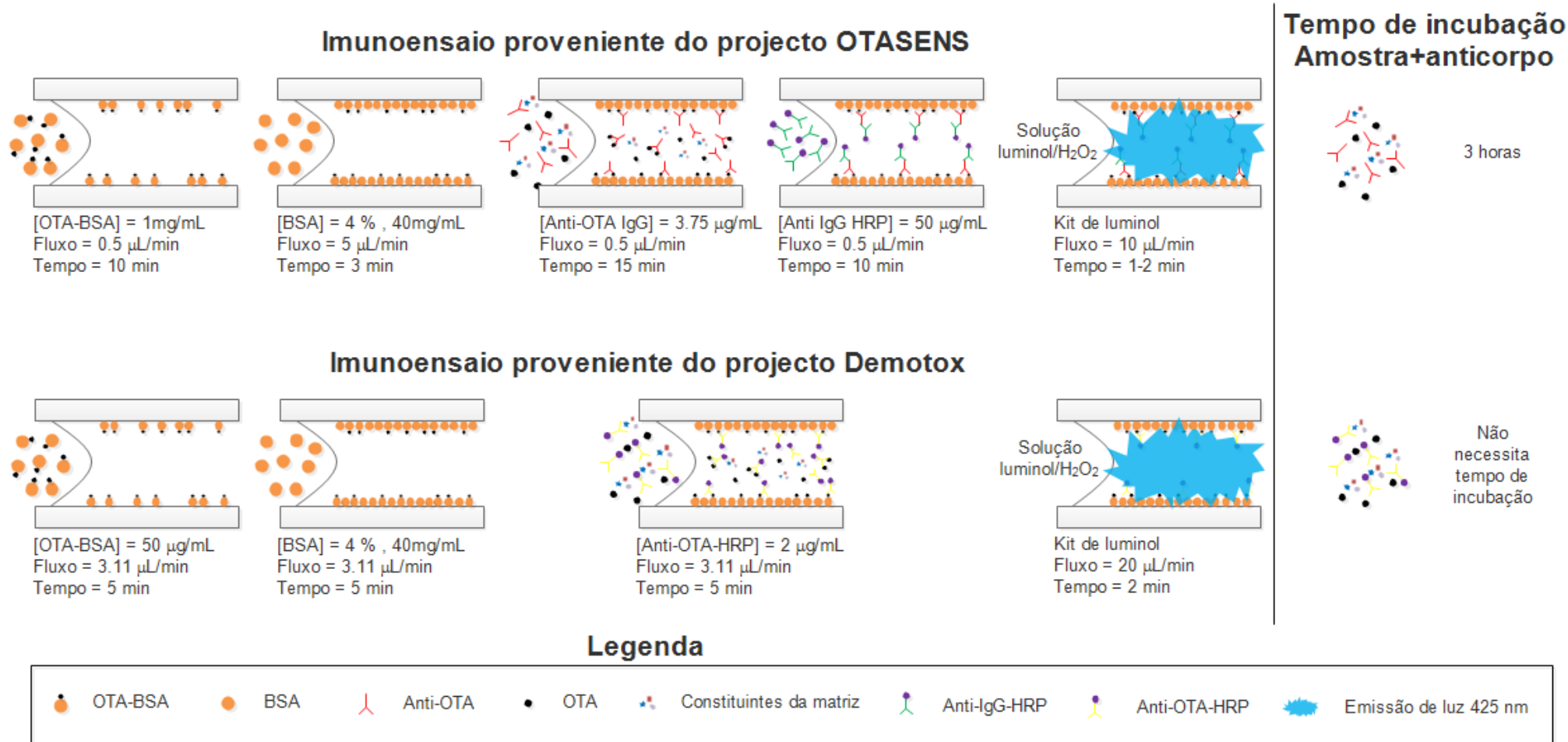


Figura 3.42 – Representação esquemática funcionamento do imunoensaio inicial e do desenvolvido ao longo deste projeto.

3.4.7. Otimização do imunoensaio miniaturizado

Devido ao elevado número de ensaios e estruturas microfluídicas necessárias para a realização do estudo sistemático de otimização do imunoensaio miniaturizado, optou-se por realizar os mesmos numa estrutura microfluídica e num sistema de detecção um pouco distinto do apresentado anteriormente.

A estrutura microfluídica, foi construída em PDMS com exatamente as mesmas dimensões dos canais, que a desenvolvida anteriormente, mas contém 13 canais independentes o que nos permite realizar seis ensaios na mesma estrutura e ter um suplente para uma eventualidade de necessidade de repetição. O sistema ótico de aquisição é exatamente o mesmo que anteriormente, existindo apenas a necessidade de recorrer a uma peça diferente de encaixe do detetor ótico e da nova estrutura microfluídica. O *software* de aquisição de dados e tratamento não sofreu qualquer modificação.

Na Figura 3.43 estão identificados os componentes e sua disposição espacial para a realização destes estudos de otimização.

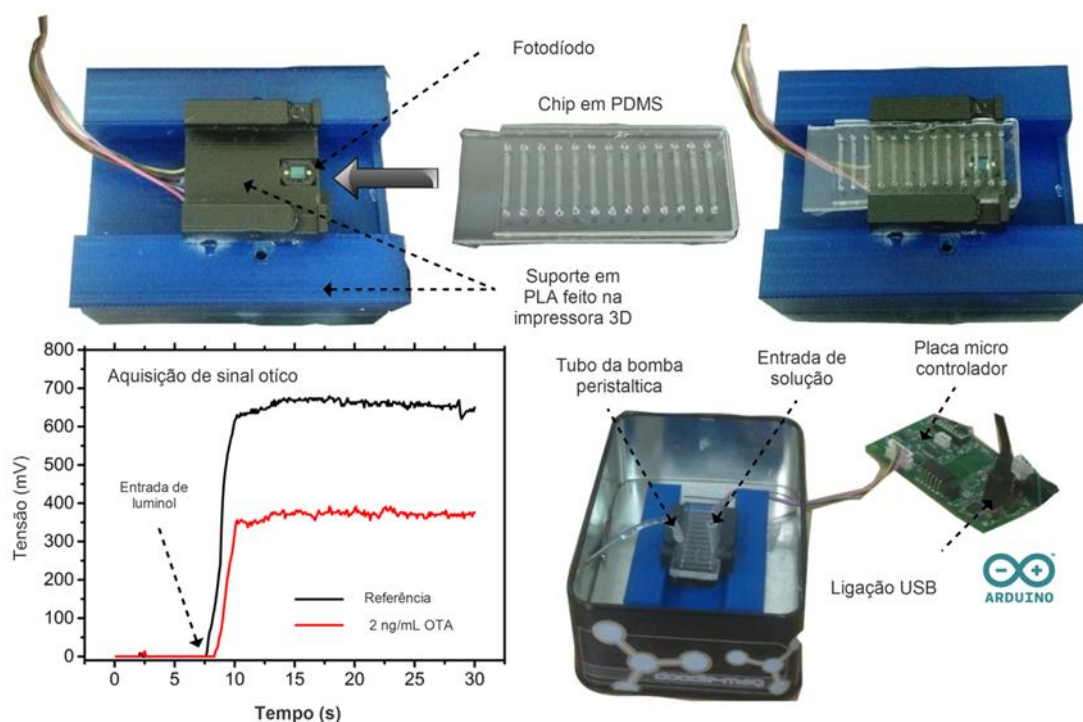


Figura 3.43 - Estrutura de suporte para aquisição ótica utilizada ao longo da otimização do sistema, estrutura de PDMS com 13 canais e uma representação gráfica ilustrativa da resposta em função da contaminação.

O microcanal em uso é alinhado com o fotodíodo, deslizando a estrutura de PDMS contendo os canais (13 canais) através do suporte impresso em 3D que contém o fotodíodo embutido e que por sua vez está ligado à placa do microcontrolador. A placa está ligada a um computador e utilizou-se a interface do *Arduino*™ para recolher as medições da tensão de saída (taxa de atualização de 0.1 s). Os resultados mostrados no lado esquerdo (Figura 3.43) foram medidos fazendo fluir o luminol com um caudal

de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ após a realização de dois imunoenaios utilizando uma solução contendo 0 ng/mL de OTA (referência) e outra contendo 2 ng/mL de OTA em tampão PBS. As medições foram realizadas com a estrutura contida dentro de uma caixa metálica fechada (gaiola de Faraday), para reduzir a interferência eletromagnética externa.

Com o objetivo de otimizar o desempenho do imunoenensaio para a detecção rápida, com maior economia de reagentes e sem comprometer a sensibilidade do ensaio, os passos de adsorção OTA-BSA e de incubação da amostra em análise foram sistematicamente analisados.

Para cada um destes passos as variáveis mais importantes são: a concentração da solução, o tempo de incubação (o tempo durante o qual as soluções são continuamente bombeadas através do microcanal) e o caudal (rapidez com que a solução é reabastecida com novas moléculas).

A otimização foi realizada de modo que um compromisso entre o valor mínimo para cada um dos parâmetros e o valor mínimo para a razão entre o sinal de referência e de 10 ng/mL de OTA fosse atingido. Além disso, esta relação deve ser obtida a partir de medições de tensão¹¹ sensivelmente acima do limiar de ruído. Para cada condição, foram realizados ensaios simultaneamente em dois microcanais independentes, um de referência (sem OTA) e outro com a “amostra” contaminada com 10 ng/mL de OTA.

O processo de otimização dos parâmetros acima mencionados para o passo de OTA-BSA está sumarizado na Figura 3.44. Na Figura 3.44a pode ser visto que o aumento das concentrações de OTA-BSA em solução proporciona um aumento da cobertura de superfície, com base nas intensidades de quimioluminescência obtidos para o canal de referência, em que um patamar é atingido a cerca de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sugerindo uma cobertura completa da superfície.

Comportamento idêntico é observado para a solução contendo 10 ng/mL de OTA. Esta é a condição de trabalho preferível uma vez que o sistema se torna menos sensível a pequenas variações na cobertura de superfície. Assim, com base nesta observação e na tendência observada para as razões de sinal, atingindo um mínimo no valor de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, esta condição foi mantida para os restantes ensaios ao longo do artigo.

Curiosamente, os resultados descritos na Figura 3.44b parecem indicar que na gama de 1-9 minutos de tempo de incubação, a cobertura de superfície obtida é virtualmente constante, o que indica que a adsorção de moléculas de OTA-BSA na superfície hidrofóbica de PDMS é um processo relativamente rápido e o equilíbrio é atingido em menos de 1 min. Esta observação está de acordo com a alta afinidade de BSA para superfícies de PDMS como previamente relatado na literatura[28]. Assim, um tempo de incubação de 1 min foi fixado para experiências subsequentes, evitando uma eventual cobertura incompleta em tempos de incubação mais curtos.

Finalmente, os resultados obtidos para o aumento de fluxo da solução de imobilização estão representados na Figura 3.44c, variando as condições desde estáticas (0 $\mu\text{L}/\text{min}$) até 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, correspondente a um tempo de residência de 2.1 s, mostram um patamar apresentado pelo sinal de referência, indicando uma total

¹¹ As correntes geradas pelo fotodiodo em resposta ao sinal ótico proveniente da reação de quimioluminescência são convertidas em valores de tensão por um conversor de alta impedância.

cobertura superficial, que é atingida com 1 min de tempo de incubação, utilizando uma taxa de fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Em resumo, as condições ótimas, como realçado na Figura 3.44 foram uma concentração de OTA-BSA de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 min de tempo de incubação e fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

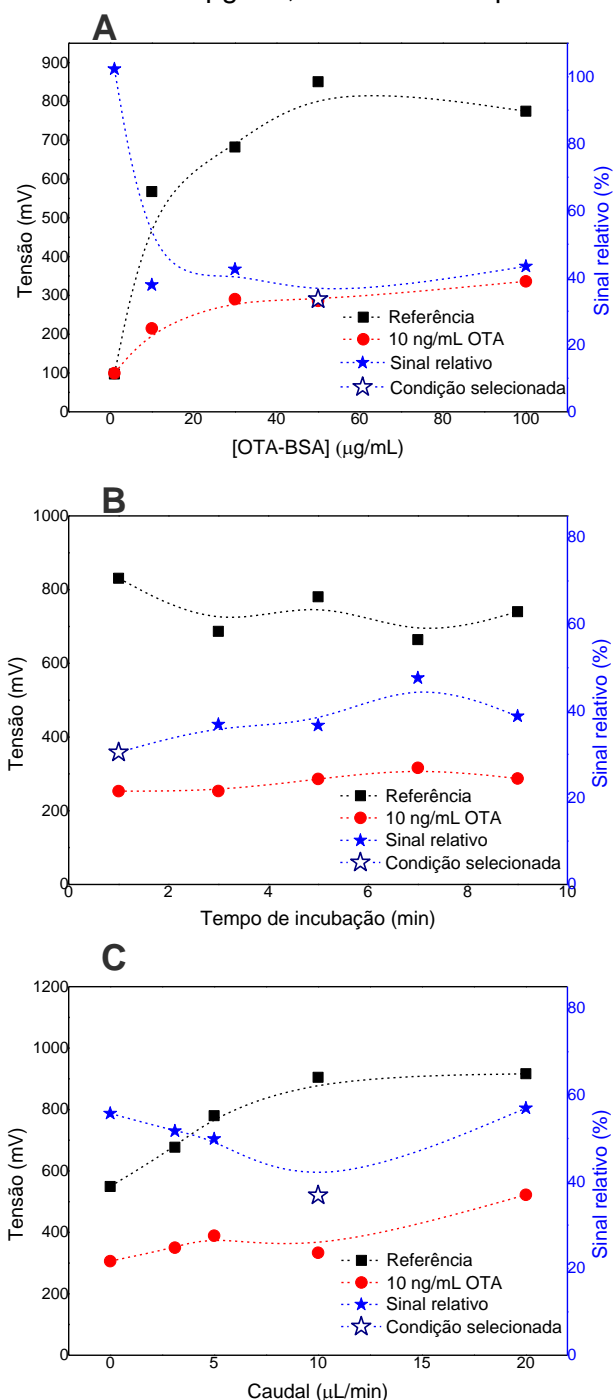


Figura 3.44 - Otimização de condições relativas à imobilização de OTA-BSA, concentração (A), o tempo de incubação usado para imobilizar o antígeno (OTA-BSA) sobre as paredes dos microcanais através adsorção (B) e o fluxo da solução através do microcanal (C). Os valores de sinal relativos são calculados dividindo a tensão absoluta obtida no canal com 10 ng/mL de OTA pela tensão absoluta obtida para o canal de referência. O fluxo e tempo de incubação em A foram fixados em 3.11 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 5 min, respectivamente. A concentração de OTA-BSA e o caudal em B foram fixados em 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3.11 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente. A concentração e tempo de incubação de OTA-BSA em C foram fixados em 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1 min, respectivamente. As condições otimizadas finais, destacado em cada representação gráfica com uma estrela vazia, foram 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a concentração, 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ para o fluxo e 1 min durante o tempo de incubação.

Um procedimento de otimização semelhante foi seguido para o anticorpo anti-OTA-HRP. Esta molécula é misturada com a amostra a analisar, SUA, contendo uma certa concentração alvo de OTA e flui através do microcanal depois de um passo de bloqueio com uma solução contendo 4% de BSA.

O processo de otimização global está resumido na Figura 3.45. Em primeiro lugar, para otimizar a concentração de anticorpo no SUA, foram selecionadas duas abordagens diferentes de análise dos dados, representados graficamente nas Figura 3.45a e Figura 3.45b, respetivamente. A primeira abordagem foi testar o efeito da concentração de anticorpos sobre a sensibilidade de deteção de OTA. Isto foi conseguido por medição de curvas de calibração utilizando concentrações crescentes de anticorpos, cada uma misturada com uma amostra com concentrações crescentes de OTA em solução tampão PBS, variando entre 0.5 a 100 ng/mL. Estas concentrações representam a maioria dos limites regulatórios para vários alimentos e rações de acordo com o regulamento da Comissão Europeia 1831/2003.

Para avaliar com precisão a sensibilidade de cada condição, um limiar de 3 vezes o desvio padrão de 12 medições de referência independentes (utilizando 2 µg/mL de anti-OTA-HRP) foi representada graficamente para definir o limite de deteção (LOD) global das medições e da variabilidade intrínseca ao ensaio. Isto implica que a cada concentração de anticorpo, a menor concentração detetável de OTA é definida pela abcissa do ponto de intersecção entre o limiar de 3σ e cada uma das curvas.

Pode ser observado na Figura 3.45a, que enquanto o declive das curvas permanece aproximadamente constante, o LOD tende a diminuir com a diminuição da concentração de anticorpo, atingindo a sensibilidade abaixo de 0.1 ng/mL de OTA com a concentração mais baixa testada de 0.5 µg/mL de anti-OTA-HRP. Esta observação é esperada em ensaios competitivos e foi previamente reportada na literatura [29][28]. Uma vez que para uma determinada concentração fixa de OTA, quanto maior a concentração do anticorpo na solução, menor é a fração molar de anti-OTA-HRP ocupado em equilíbrio com OTA livre, implicando um menor sinal relativo da referência. No entanto, a concentração do anticorpo que fornece a sensibilidade mais alta não é necessariamente a condição ótima, uma vez que uma maior sensibilidade compromete simultaneamente os sinais de tensão absolutos obtidos. Isto pode ser observado na Figura 3.45b.

Verifica-se que ambos os sinais, de referência e 10 ng/mL de OTA, aumentam quase linearmente com o aumento da concentração de anticorpo, demonstrando o mesmo efeito para as razões entre ambos. Por conseguinte, a fim de proporcionar uma sensibilidade suficiente e simultaneamente um largo intervalo linear (cerca de 3 ordens de magnitude), foi selecionada a concentração de 2 ng/mL.

O tempo de incubação e o fluxo foram igualmente otimizados tendo em conta a imobilização da anti-OTA-HRP, dentro do mesmo intervalo de valores utilizados para a OTA-BSA. Curiosamente, verifica-se através da análise da Figura 3.45c uma dependência linear entre o tempo de incubação e os sinais obtidos em ambos os canais, referência e 10 ng/mL. Duas conclusões podem ser tiradas a partir desta observação, em primeiro lugar, o controlo do tempo de incubação para o anticorpo primário é crítico para a exatidão e reprodutibilidade. Em segundo lugar, uma vez que foi dada uma margem conservadora acima dos valores considerados ruído na otimização de concentração de anticorpo, torna-se possível uma redução do tempo de

ensaio de 5 para 3 min, tornando possível ter um tempo de análise mais reduzido aumentando a concentração de anticorpo sem existir perda de sensibilidade. Devido a limitações práticas de manutenção de tempos de incubação ainda mais curtos de forma reprodutível, não foi efetuada a posterior diminuição do tempo de incubação para além dos 3 minutos.

Finalmente, a otimização do fluxo foi fixada em 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, uma vez que de acordo com as representações gráficas da Figura 3.45d, enquanto o sinal da amostra contaminada não varia apreciavelmente com o aumento de caudal, atingindo um máximo a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A existência desse valor máximo, à semelhança do que foi observado para a OTA-BSA, pode estar relacionado com uma cobertura máxima da superfície, contudo neste caso é um pouco diferente uma vez que o sinal máximo é um pico, em vez de um patamar e progressivamente diminui para fluxos mais elevados. Tal observação pode ser devida a um aumento da erosão dos anticorpos imobilizados, derivada de uma mais elevada tensão de cisalhamento a que os complexos OTA-BSA-anticorpo-HRP estão expostos em relação a apenas OTA-BSA.

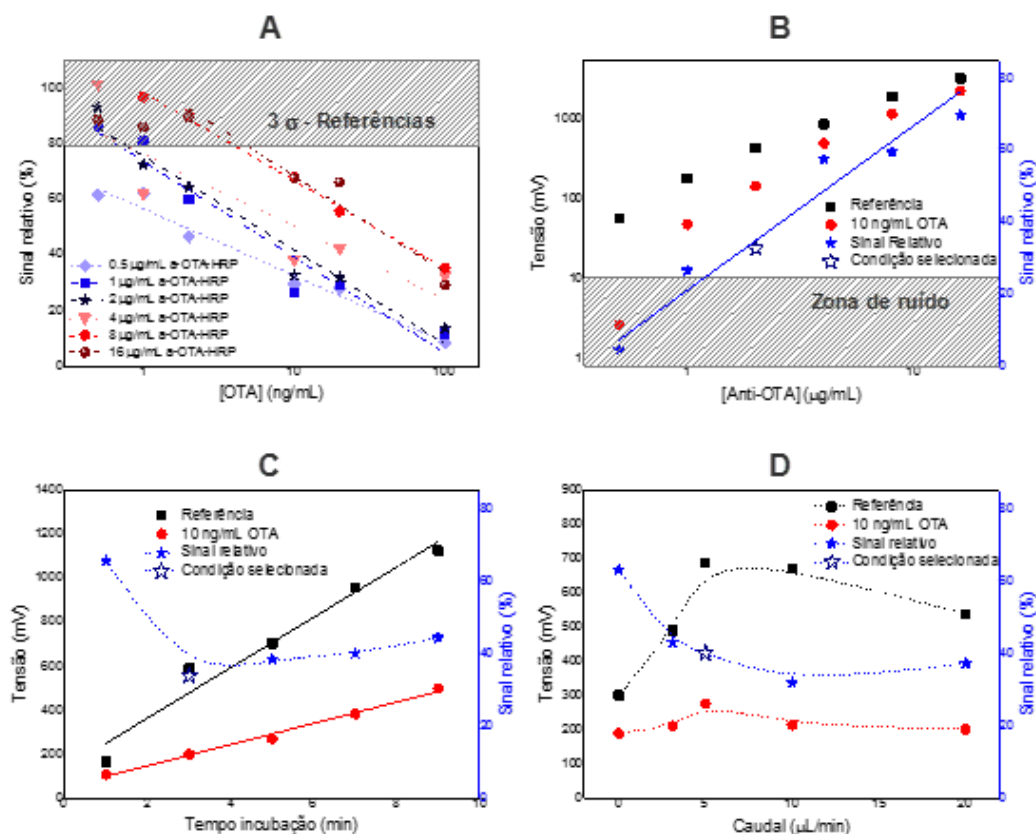


Figura 3.45 - Otimização da concentração de anti-OTA-HRP (a-OTA-HRP) na SUA (A e B), tempo de incubação (C) e fluxo da solução através do microcanal (D). Todos os ensaios foram realizados utilizando as condições de adsorção de OTA-BSA previamente otimizadas na figura 47. A intersecção da linha 3 σ com cada uma das curvas define a concentração mínima OTA que é capaz de fornecer um sinal igual a três vezes o desvio padrão de 12 das medições de referência (realizada com uma concentração única de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sinais relativos são calculados dividindo o valor de tensão obtido para uma dada concentração de OTA pelo valor obtido para a referência. O fluxo e o tempo de incubação em A e B foram fixadas em 3.11 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 5 min, respetivamente. A concentração de anti-OTA-HRP e o fluxo em C foram fixadas em 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3.11 $\mu\text{L}/\text{min}$, respetivamente. A concentração e tempo de incubação de anti-OTA-HRP em D foram fixadas em 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3 minutos, respetivamente. As condições finais otimizadas estão destacadas em cada representação gráfica por uma estrela a vazia, correspondendo a uma concentração de anti-OTA-HRP de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fluxo da solução de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 3 minutos para o tempo de incubação.

Após otimizar cada uma das principais variáveis para a imobilização de OTA-BSA e anticorpo primário, foi realizada uma curva de calibração de concentrações crescentes de OTA (0.5 -100 ng/mL) usando as condições ótimas encontradas. Os resultados são apresentados na Figura 3.46, a figura inserida apresenta os valores de tensão obtidos para 12 ensaios de referência independentes em comparação com a linha reta que apresenta o valor médio (526 mV). O desvio padrão (σ) das 12 medições foi usado para calcular o LOD (concentração correspondente a um sinal de 79%) como aqui definido 3σ e representado graficamente como uma linha reta tracejada. Observa-se que toda a curva é inferior ao LOD, assim, a configuração otimizada pode detetar pelo menos 0.5 ng/mL de OTA na solução, que está dentro da gama necessária para satisfazer os limites de regulação, na maioria dos alimentos e rações. A curva apresenta uma regressão logarítmica com a seguinte equação $y = m.\log(x) + b$, com $m = -7.744$ e $b = 67.449$.

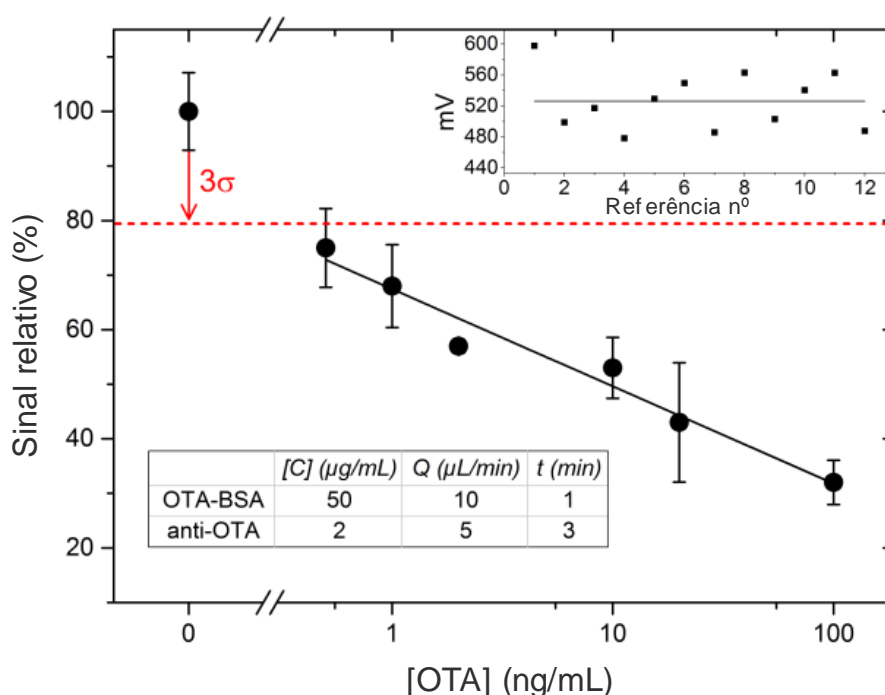


Figura 3.46 - Curva de calibração obtida para sinal relativo obtido entre referência e amostra em função da concentração de OTA, nas condições ótimas apresentadas na tabela para o sistema otimizado. O gráfico inserido mostra os resultados obtidos para as 12 referências preparados de forma independente, em relação ao valor médio representado como uma linha reta. O valor do desvio padrão para este valor médio multiplicado por 3 corresponde à linha tracejada vermelha no gráfico principal. A intersecção da linha tracejada vermelha com a curva de calibração corresponde ao limite de detecção (LOD), situa-se acima de 0.5 ng/mL de OTA.

Deteção de OTA em amostras reais (vinho).

Após o estudo em tampão efetuou-se uma experiência de forma a avaliar se o ensaio otimizado pode ser utilizado para quantificar OTA no limite de regulação (2 ng/mL) em extratos de vinho tinto. Esta matriz alimentar foi selecionada uma vez que proporciona efeitos pronunciados de interferência[15][28][25][30] e exige uma deteção altamente sensível para lidar com o baixo limite regulamentar, proporcionando assim um cenário de pior caso. Uma vez que foi anteriormente observado em várias configurações de imunoensaios para detetar OTA, diretamente no vinho tinto em bruto,

que recorrer unicamente a um ajuste do pH não conduzia a uma sensibilidade adequada, foi necessário recorrer a um método de extração. Para processar as amostras de vinho contaminadas artificialmente em laboratório, utilizou-se o método de extração desenvolvido por Soares e outros para remover a interferência da matriz e concentrar as moléculas de OTA em solução [25].

As etapas do processo são descritas em detalhe na secção 3.3.3., em resumo, compreende a contaminação artificial de três amostras de vinho tinto com 2 ng/mL de OTA, que foram então sujeitas a um passo de extração usando um sistema aquoso de duas fases. Em seguida, a fase de concentrado de PEG com contaminante foi usada diretamente como a SUA para a análise. As referências foram preparadas da mesma maneira usando o vinho tinto não contaminado.

Os resultados das leituras de tensão ao longo do tempo são apresentados na Figura 3.47 e os valores absolutos obtidos a partir de uma média do patamar (entre 15 e 25 s) são mostrados na imagem inserida no gráfico principal da figura. As medidas foram realizadas em 6 canais independentes. As relações sinal obtidos foram de 77, 67 e 79% para cada uma das primeiras, segunda e terceira repetições, respetivamente, uma média de um sinal de redução de sinal em relação à referência de $74.3 \pm 6.4\%$, imediatamente abaixo do limiar de detecção de 79.0%.

Assim, pode-se concluir que o ensaio otimizado pode eficazmente detetar a presença de OTA em vinhos tintos, para os limites regulamentares, assumindo que o passo de preparação da amostra é efetuada previamente e de forma eficiente.

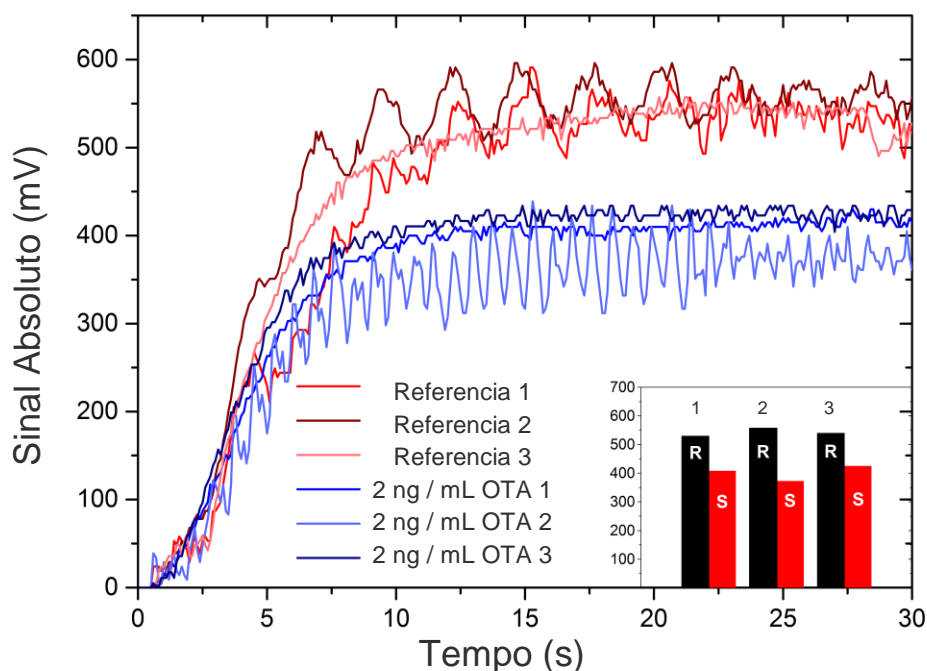


Figura 3.47 - Representação da aquisição de sinal em tempo real para três referências independentes e três amostras de vinho contaminadas com 2 ng/mL de OTA enquanto a solução de luminol flui através do microcanal com fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ambas as referências e amostras enriquecidas foram preparadas em vinho tinto bruto e posteriormente processados de acordo com o método descrito no capítulo 2 referente à parte experimental. A imagem inserida no canto inferior direito mostra o sinal de tensão obtido para a referência (rotulados R) e amostra contaminada (S) em cada um dos três ensaios independentes. A variabilidade inter-ensaio em termos de oscilações observadas durante o patamar sugerem alguma interferência eletromagnética.

3.4.8. Validação do equipamento

A importância de métodos rápidos para a análise de micotoxinas em alimentos e rações já foi amplamente mencionada ao longo do presente capítulo. No entanto antes de um teste rápido poder ser usado a nível comercial, a sua “adequação à finalidade” deve ser demonstrada em particular para testes como os desenvolvidos com uma resposta binária, sim/não.

Holst *et al.* [31] no seu artigo “Performance criteria for rapid screening methods to detect mycotoxins” descrevem o processo de validação de métodos de triagem (“*screening*”) de micotoxinas para classificar as amostras como negativas ou suspeitas de serem positivas. O conceito é baseado no princípio que amostras negativas são considerados em conformidade, e que amostras suspeitas de serem positivas necessitam de ser reanalisadas com métodos confirmatórios.

Em relação a estratégias de validação adequadas, dois tipos de métodos diferentes de triagem podem ser identificados:

- 1 – Os métodos que geram uma resposta numérica, que é então comparada com um valor de cut-off, e
- 2 – Métodos em que a análise é baseada exclusivamente em uma inspeção visual (por exemplo, de desenvolvimento de cor).

Embora ambos os tipos conduzam a um resultado binário (ou seja, presença/ausência do analito alvo acima de um limiar pré-determinado), eles necessitam de tratamento de dados significativamente diferentes, dentro do quadro de validação do método[31].

Para o equipamento desenvolvido no âmbito de projeto Demotox (DemoBio), optou-se por realizar a validação do mesmo de acordo com a regulamentação da Comissão Europeia[32]: **519/2014**. Esta regulamentação descreve os procedimentos a adotar para a validação de equipamentos envolvendo métodos bioanalíticos baseados em imuno-reconhecimento ou em ligações aos recetores (tais como o teste ELISA, indicadores de nível, dispositivos de fluxo lateral, imunossensores), e para o qual o resultado do teste é um valor numérico.

A primeira decisão a tomar quanto ao rumo da validação, prende-se com o tipo de amostra (vinho, cereais, cerveja) a utilizar na validação. As amostras reais escolhidas ao longo deste trabalho foram cereais de alimentação animal, o que levou a que a decisão da escolha da amostra de teste recaísse-se sobre este género de amostra, pois fez parte do consórcio para este projeto uma empresa (Ewos) Norueguesa que tem produção de salmão, a ração para alimentação do salmão é à base de cereais. A mais-valia nesta escolha apresenta-se pela existência de amostras naturalmente contaminadas e já analisadas dentro da empresa.

Outra decisão importante recai na escolha do nível de contaminação a determinar para validar os ensaios. Segundo os limites da união europeia, limites legais pela recomendação 576 da comissão europeia datada de 17 de Agosto de 2006[33], para produtos de alimentação animal como cereais e produtos a base de cereais é de 250 ppb.

Sendo o limite legal de 250 ppb, optou-se por diluir 5 vezes o resultante da extração (descrito na secção 3.3.3 em método de extração para amostras de cereais) e fazer os ensaio para 50 ppb, deste modo é possível ficar com o ensaio determinante para o limite legal, ao mesmo tempo que sem diluir se consegue analisar a amostra naturalmente contaminada proveniente da Ewos com 44 ppb.

O regulamento da união europeia aplica a seguinte terminologia:

Concentração de rastreio visada (STC): a concentração pertinente para a deteção de micotoxinas numa amostra. Quando o objetivo é o de testar o cumprimento dos valores limite regulamentares, a STC é igual ao limite máximo aplicável. Para outros fins, ou se não tiver sido estabelecido um limite máximo, a STC é predefinida pelo laboratório.

Amostra negativa: o teor de micotoxinas na amostra é $< \text{STC}$, com um nível de confiança de 95 % (ou seja, existem 5 % de probabilidades de que as amostras sejam incorretamente registadas como negativas).

Amostra falsa negativa: o teor de micotoxinas na amostra é $> \text{STC}$, mas foi identificado como negativo.

“Amostra suspeita” (rastreio positivo): a amostra excede o valor-limite (ver infra) e o seu teor de micotoxinas pode situar-se a um nível superior à STC. Qualquer resultado suspeito desencadeia uma análise de confirmação para uma identificação inequívoca e quantificação da micotoxina.

Amostra falsa suspeita: uma amostra negativa que foi identificada como suspeita.

Métodos de confirmação: métodos que fornecem indicações completas ou complementares que permitem a identificação e a quantificação inequívoca da micotoxina ao nível pertinente.

Valor-limite: a resposta, a indicação ou concentração, obtida através do método de rastreio, acima da qual a amostra é classificada como “suspeita”. O valor-limite é determinado durante a validação e tem em conta a variabilidade da medição.

Amostra de controlo negativo (matriz em branco): uma amostra conhecida como estando isenta da micotoxina objeto de rastreio, por exemplo, devido a uma determinação anterior em que se utilizou um método de confirmação com sensibilidade suficiente. Se não podem ser obtidas amostras em branco, pode ser utilizado material com o menor nível alcançável, desde que o nível permita concluir que o método de rastreio é adequado à sua finalidade.

Amostra de controlo positiva: amostra que contém a micotoxina à concentração de rastreio visada (por exemplo, um material de referência certificado, um material com um teor conhecido, um material de testes de aptidão) ou suficientemente caracterizada através de um método de confirmação. Na ausência de qualquer dos métodos supra, pode ser utilizada uma mistura de amostras com níveis de contaminação diferentes ou uma amostra enriquecida, elaborada no laboratório e suficientemente caracterizada, desde que se possa provar que o nível de contaminação foi verificado.

O processo de validação tem como objetivo demonstrar a adequação do método de rastreio à sua finalidade. Tal é feito por meio da determinação do valor-limite e pela determinação da taxa de falsos negativos e falsos suspeitos. Nestes dois parâmetros, estão incluídas características de desempenho, tais como a sensibilidade, a seletividade e a precisão.

A validação deve ser executada para cada mercadoria, ou, quando o método for reconhecidamente aplicável a várias mercadorias, para cada grupo de mercadorias. Neste último caso, é selecionada uma mercadoria representativa e relevante nesse grupo.

O número mínimo de amostras diferentes necessárias para fins de validação são 20 amostras de controlo negativo homogéneas e 20 amostras de controlo positivas homogéneas que contenham a micotoxina na STC, analisadas em condições de precisão intermédia (RSDRi), ao longo de cinco dias diferentes. Em alternativa, conjuntos suplementares de 20 amostras que contenham micotoxinas a outros níveis podem ser adicionadas ao conjunto de validação para compreender até que ponto o método permite distinguir entre diferentes concentrações de micotoxinas.

Para cada STC a utilizar na aplicação de rotina, tem de ser efetuada uma validação.

A validação do equipamento (DemoBio) com a finalidade de verificar a sua capacidade para detetar Ocratoxina A foi estruturada do seguinte modo:

Cinco utilizadores diferentes, em cinco dias diferentes com 20 amostras de controlo negativo e 20 amostras de controlo positivo, organizado como descrito na Figura 3.48.

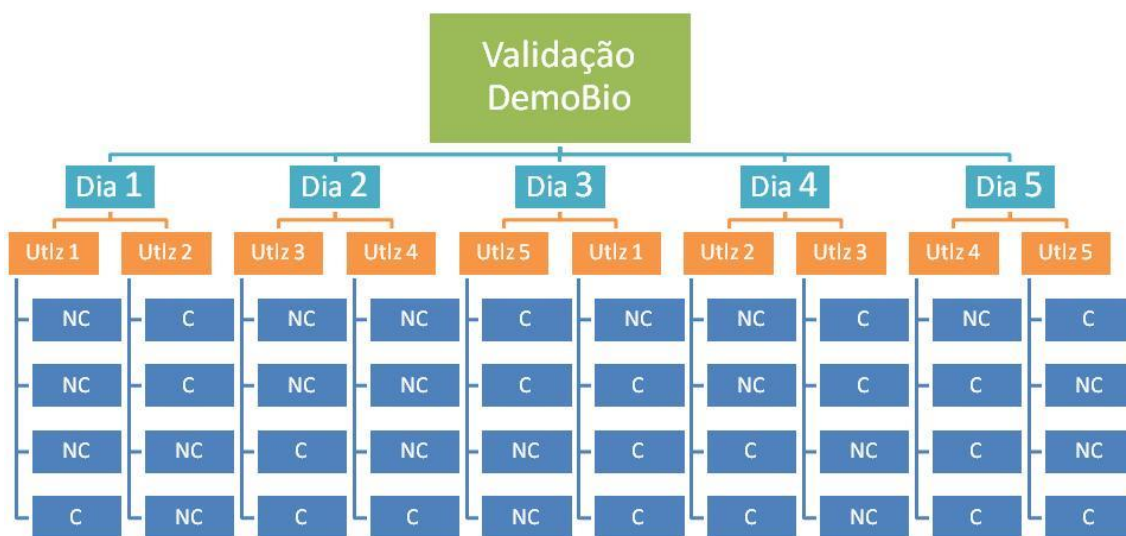


Figura 3.48 – Ilustração do método de validação experimental, o número de amostra para a validação consiste em 20 amostras de controlo e 20 amostras contaminadas com Ocratoxina A na concentração pretendida. Ensaio realizado em 5 dias diferentes e efetuados por 5 utilizadores distintos. NC – não contaminado; C – contaminado no nível STC.

O processo de validação foi efetuado por 3 vezes, uma realizada em solução tampão (PBS 7.2) com a amostra de controlo negativa com 0 ppb de OTA e o controlo positivo com 50 ppb de OTA. Este tipo de teste permite avaliar a capacidade do método sem interferência do processo de extração e de contaminação devido ao efeito da matriz. Com estes resultados é possível verificar o impacto de realização dos ensaios em diferentes dias e por diferentes utilizadores.

O segundo processo de validação foi efetuado contaminando artificialmente os cereais antes do processo de extração descrito no capítulo 2, permitindo analisar a influência do processo de extração nos resultados.

A terceira e última validação foi efetuada utilizando cereais naturalmente contaminados com 44 ppb, verificando assim a eficiência do processo de extração.

Validação em solução tampão (PBS 7.2).

O estudo é feito recorrendo à tabela apresentada na Figura 3.48.

Para a realização dos ensaios por diferentes utilizadores foi solicitado aos seguintes colaboradores da empresa e a um elemento do INESC-MN a sua colaboração na validação.

Tabela 3.5 – Identificação dos diversos utilizadores que efetuaram a validação do equipamento Demobio.

Nome	Utilizador (sigla)
Diogo Ramadas	Utlz 1
António Cascalheira	Utlz 2
Joana Monteiro	Utlz 3
Miguel Freitas	Utlz 4
Ruben Soares (INESC-MN)	Utlz 5

A validação foi efetuada com o equipamento na sua fase final, deste modo a cada utilizador coube a tarefa de por cada ensaio representado na Figura 3.48 introduzir um chip no equipamento, preparar as soluções como descrito no manual do mesmo e fazer um ensaio completo.

As estruturas microfluídicas foram entregues nas mesmas condições que seriam entregues a um possível cliente, já com a imobilização de antigénio, bloqueio e respetiva lavagem efetuada.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela seguinte ordenados por controlo negativo e controlo positivo e o número da amostra está correlacionado com a Figura 3.48 por ordem cronológica.

Tabela 3.6 – Resultados obtidos para o ensaio de validação em tampão PBS 7.2, com controlo negativo e controlo positivo na STC (50 ppb).

Controlo negativo		Tampão com STC (50ppb)	
Amostra	Sinal (%)	Amostra	Sinal (%)
1	93	4	35
2	90	5	30
3	92	6	27
7	87	11	30
8	96	12	28
9	92	16	35
10	90	17	30
13	95	18	36
14	93	22	35
15	92	23	33
19	91	24	32
20	95	27	28
21	91	28	32
25	95	29	25
26	89	30	37
31	91	34	35
32	92	35	30
33	91	36	33
38	95	37	28
39	89	40	36
Média	91.95		31.8
Desv Padrão	2.4		3.5
Valor limite		37.8	
Falsos positivos			0.00%

Para métodos de rastreio com uma resposta inversamente proporcional à concentração de micotoxinas, o valor-limite é determinado da seguinte forma:

$$Valor\ limite = \sum STC + Valor\ t_{0.05} \times Desv\ Padrão\ STC \quad (3.1)$$

Utilizando este valor t específico para estabelecer o valor-limite, a percentagem de resultados falsos negativos é, por defeito, fixada em 5 %.

O valor de t teórico é retirado de um tabela de distribuição de *t-student*, com 19 graus (nº amostras -1) de liberdade e 95% de nível de confiança, $t = 1.729$.

Os resultados das amostras de controlo negativas são utilizados para estimar a percentagem correspondente de resultados falsos positivos. O valor t é calculado da seguinte forma:

$$Valor\ t = \frac{\sum Controlo\ negativo - valor\ limite}{Desv\ Padrão\ (controlo\ negativo)} \quad (3.2)$$

Os resultados obtidos na ausência de toxinas demonstram que a média de todos os ensaios é de 92% enquanto que o coeficiente de variação se situa nos 3%. No caso dos ensaios contaminados obteve-se 32% de média e 11% de coeficiente de variação.

O valor limite obtido define o nível acima do qual não se obtêm nenhum falso negativo com 95% de certeza.

Na Figura 3.49 estão representados os resultados obtidos e apresentados na Tabela 3.6, a linha do valor limite foi calculada segundo o método de cálculo obtido na informação proveniente da regulamentação da união europeia (EU nº 519/2014), e descrito anteriormente. Pela observação da representação gráfica é possível inferir que existe uma grande separação entre o sinal referente ao controlo negativo e ao contaminado com STC.

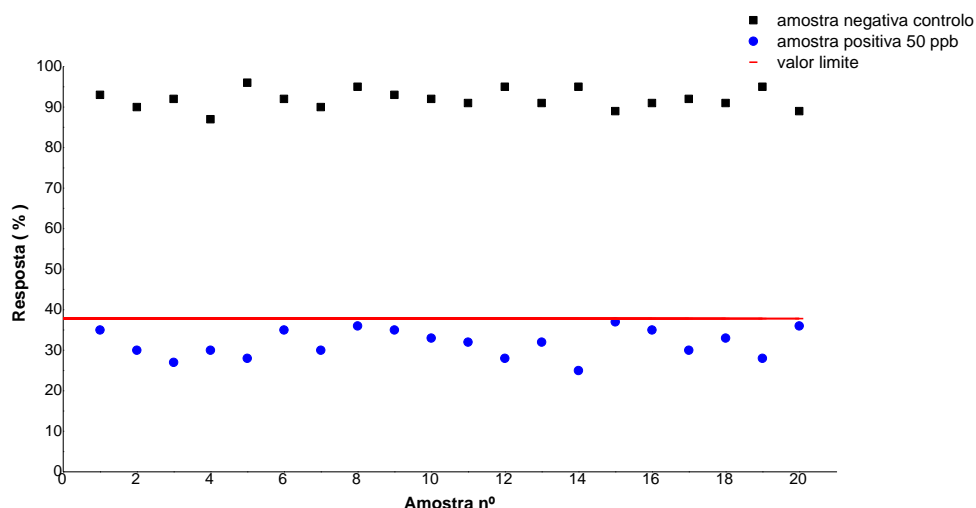


Figura 3.49 – Representação gráfica dos valores obtidos na validação em PBS 7.2 para 20 amostras de controlo negativo e 20 amostras de controlo positivo na STC.

De acordo com o processo de validação a resposta mais baixa para o controlo negativo não deve coincidir com a linha limite, se ocorrer é considerada uma amostra suspeita; no caso em que se usam 20 amostras somente uma delas (5%) pode ser considerada como suspeita de acordo com o método. Torna-se claro que tal não acontece em solução tampão.

O resultado mais relevante retirado da Figura 3.49 é a clara separação existente entre as amostras de controlo negativo e as amostras de controlo positivo demonstrando inequivocamente que as amostras não contaminadas estão acima do valor limite, comprovado pela representação gráfica e pelos resultados estatísticos.

Avaliando o perfil estimado de precisão do método verifica-se que o valor de coeficiente de variação varia entre 3 e 11 %, considerado aceitável dentro da gama existente de testes de rastreio.

Após verificação da fiabilidade do sistema em tampão, realizou-se a mesma validação para o sistema incluindo a técnica de extração desenvolvida pelo grupo do INESC-MN (descrita na secção 3.3.3 em método de extração para amostras de cereais).

Validação em cereais artificialmente contaminados.

Os cereais foram contaminados com 250 ppb, seguindo-se o processo de extração e o volume que se retira de extrato é diluído 5 vezes, de modo a que o valor limite continue a ser 50 ppb. No ensaio em tampão foram adicionados 10 μL da solução contaminada a 23.3 μL de solução de anti-OTA-HRP, neste caso adicionaram-se 2 μL de extrato + 8 μL de PBS a 23.3 μL de anti-OTA-HRP.

Na tabela seguinte são apresentados os resultados em bruto obtidos de acordo com a validação descrita anteriormente e realizada pelos mesmos utilizadores.

Tabela 3.7 - Resultados obtidos para o ensaio de validação em cereais artificialmente contaminados com 250 ppb e o extrato diluído 5 vezes de modo a que o controlo positivo tenha concentração de 50 ppb.

Controlo negativo/extrato		Extrato artificialmente contaminado com STC (50 ppb)	
Amostra	Sinal (%)	Amostra	Sinal (%)
1	90	4	45
2	89	5	47
3	77	6	42
7	68	11	43
8	75	12	43
9	88	16	40
10	80	17	42
13	88	18	40
14	69	22	41
15	72	23	42
19	75	24	43
20	89	27	40
21	88	28	48
25	84	29	48
26	74	30	46
31	71	34	46
32	84	35	45
33	83	36	47
38	82	37	44
39	76	40	45
Média	80.1		43.9
Desv Padrão	7.3		2.6
Valor limite		48.4	
Falsos positivos			0.02%

Os resultados de controlo negativo apresentam uma média de 80,1% com coeficiente de variação de 9% enquanto que para o controlo positivo a media é 43.9% e coeficiente de variação de 6%. O valor limite calculado é de 48.4%, com 95% de certeza que qualquer valor acima deste limite é de uma amostra não contaminada. O valor limite e de falsos positivos foram calculados como descrito para a validação em tampão.

Como se verifica pela Figura 3.50 a separação entre os valores das amostras de controlo e as amostras contaminadas com STC é bastante notória, contudo menos

acentuada do que na validação efetuada somente em tampão. É possível que o aumento do valor limite seja proveniente do efeito da matriz.

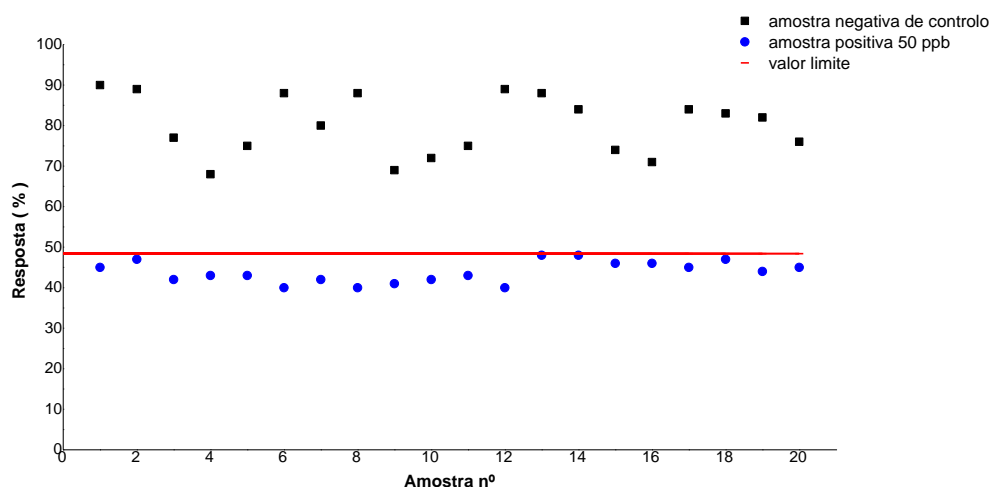


Figura 3.50 - Representação gráfica dos valores obtidos na validação em cereais artificialmente contaminados para 20 amostras de controlo negativo e 20 amostras de controlo positivo na STC.

Não contabilizando o efeito da matriz, é possível aferir que o processo de extração desempenha eficazmente o propósito para o qual foi criado, e com boas taxas de recuperação, uma vez que o valor limite em tampão somente subiu de 38% para 48%.

Em face de o rastreio da toxina para valor limite de 50 ppb ter sido efetuado com sucesso, decidiu-se fazer uma validação em cereais de alimentação animal naturalmente contaminados, provenientes de uma empresa que pertence ao consórcio, EWOS, e analisada através de laboratórios certificados contendo 44 ppb em OTA.

Validação em cereais naturalmente contaminados com 44 ppb.

Os resultados em bruto obtidos para a validação em cereais naturalmente contaminados com 44 ppb são apresentados na Tabela 3.8.

Neste caso utilizaram-se cereais idênticos provenientes também da EWOS não contaminados para utilização como amostra negativa de controlo.

Tabela 3.8 - Resultados obtidos para o ensaio de validação em cereais naturalmente contaminados com 44 ppb.

Controlo negativo/extrato		Extrato naturalmente contaminado (44 ppb)	
Amostra	Sinal (%)	Amostra	Sinal (%)
1	81	4	58
2	74	5	55
3	78	6	53
7	96	11	61
8	85	12	53
9	83	16	75
10	99	17	62
13	79	18	49
14	82	22	75
15	98	23	65
19	96	24	49
20	79	27	64
21	96	28	68
25	97	29	63
26	90	30	64
31	89	34	31
32	89	35	64
33	100	36	67
38	96	37	58
39	89	40	61
Média	88.8		59.8
Desv Padrão	8.2		9.9
Valor limite		76.9	
Falsos positivos		8.07%	

Os resultados para a amostra negativa de controlo apresentam media de 88.8% e coeficiente de variação de 9%, as amostras de controlo positivo apresentam média de 59.8 e um coeficiente de variação superior aos obtidos anteriormente e igual a 17%, fazendo com que o valor limite calculado com 95% de certeza se estabeleça nos 76.9%.

Pela observação da representação gráfica, Figura 3.51, verifica-se que neste caso não existe uma clara separação entre as de controlo positivo e as de controlo negativo, aumentando assim a possibilidade de existência de falsos positivos de 0% e 0.02% nos dois primeiros casos para 8% nas amostras naturalmente contaminadas. O aparecimento de falsos positivos não é fator crucial para o êxito do método de rastreio, mas sim a possibilidade de existência de falsos negativos.

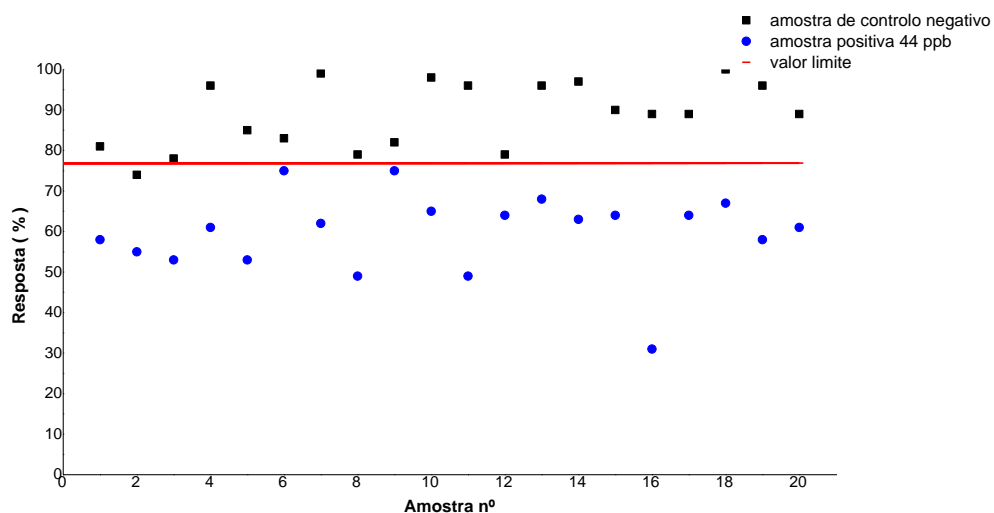


Figura 3.51 - Representação gráfica dos valores obtidos para a validação em cereais naturalmente contaminados com 44 ppb e para 20 amostras de controlo negativo de um conjunto de cereais idênticos não contaminados.

A grande variação de resultados pode advir da má homogeneização da amostra naturalmente contaminada. Com as experiências realizadas anteriormente foi possível obter conhecimento para conseguir aumentar a distância entre os valores de amostras de controlo positivo e negativo, e assim customizar o valor limite para cada caso.

Após o processo de validação do equipamento e respetivas estruturas microfluídicas constata-se que os resultados confirmam a aplicabilidade geral do teste de diferenciar entre amostra com Ocratoxina A, aos limites regulamentares europeus, e amostras em branco, com uma taxa de falsos positivos muito baixa.

A implementação do sistema desenvolvido como um teste de despiste semi-quantitativo para a OTA, pode aumentar o número de análises efetuados no local, e evitar o envio de amostras em branco para um laboratório externo para realizar o método oficial.

3.5. Conclusões

No presente capítulo compilaram-se os resultados efetuados no âmbito deste doutoramento decorrentes da participação da empresa Lumisense Lda num projeto europeu denominado Demotox.

Este capítulo adotou uma componente mais tecnológica na primeira parte relativa ao *design* e teste de componentes para a construção de um protótipo pré-industrial e uma componente mais científica no desenvolvimento e otimização de um imunoensaio miniaturizado para deteção de OTA em amostras reais.

No desenvolvimento do equipamento executado durante este trabalho permitiu atingir os requisitos técnicos previamente impostos:

- Portabilidade, tamanho máximo: 25 x 10 x 5 cm
- Peso inferior a 1 Kg, compacto.
- Sensibilidade: menor que 1 ng/mL de OTA em tampão, para matrizes complexas (vinho tinto) prevê-se menor sensibilidade.
- Tempo de ensaio curto (uma ordem de magnitude menos que os ensaios tradicionais).
- Rápida resposta.
- Diminuição do uso de solventes orgânicos, maioritariamente usados em técnicas tradicionais.
- Preço total do protótipo inferior a 3000 €.
- Não requerer pessoal especializado para o ensaio.
- Conexão a um sistema informático e *software* de interface simples para o utilizador.

Na construção do protótipo o tamanho máximo e peso do equipamento não excederam os valores delineado como máximos, ficando na versão final com o tamanho de: 15 x 10 x 5 cm e 0.220 Kg.

O sistema de controlo dos líquidos foi alterado, eliminando o detetor de bolhas, as válvulas e a câmara de gotas, sendo substituídos por um sistema direto de introdução de líquido no chip que percorre um percurso único desde a entrada até ao reservatório de recolha de soluções usadas.

Idealizou-se, construiu-se e caracterizou-se uma bomba peristáltica miniatura que servisse os requisitos impostos pela limitação de espaço e permitissem realizar ensaios com fluxos bastantes diminutos. Uma grande vantagem da bomba construída foi a capacidade de a mesma permitir puxar e empurrar líquido, apenas invertendo a rotação do motor, relevando-se esta capacidade crucial para o desenvolvimento dos imunoensaios.

As placas eletrónicas foram redesenhadas de modo a ficarem mais pequenas e a condensar todas as necessidades numa placa única, e alteradas de modo a que permita alimentação com 5V DC em vez de 15V DC. Esta alteração permite a utilização de baterias portáteis, como baterias para carregar telemóveis, tornando o equipamento totalmente autónomo de rede elétrica.

Foi criado um *software* que utiliza como interface qualquer aparelho com sistema operativo *android*. Este programa foi desenvolvido com o principal objetivo de ser simples e intuitivo para o utilizador.

A estrutura microfluídica foi redesenhado de modo a não ser necessário manuseamento por parte do utilizador para fazer a conexão ao sistema de microfluídica.

O ensaio proveniente do projeto Otasens consistia num imunoensaio competitivo indireto tendo sido alterado para um ensaio competitivo direto, envolvendo menos um passo a efetuar pelo utilizador. Esta mudança deveu-se ao fato de alterar o anticorpo primário por um anticorpo já marcado com HRP, não sendo necessário o uso de anticorpo secundário marcado com HRP para dar sinal ótico. Mesmo com a desvantagem de se realizar um canal de cada vez em vez dos dois em simultâneo, conseguiu-se reduzir o tempo total do ensaio de 33 minutos para 15 minutos.

O processo de extração desenvolvido pelo INESC-MN demonstrou ser uma ferramenta essencial para o sucesso do ensaio e para o cumprimento dos requisitos propostos no desenvolvimento desta técnica de medida, uma vez que não usa qualquer tipo de solvente orgânico em contraste com o processo de extração proveniente do Otasens.

Foi desenvolvida uma nova estratégia de deteção biológica de OTA baseada num imunoensaio competitivo direto por quimioluminescência em canais de microfluídica. A influência de diversos parâmetros experimentais no desempenho do imunoensaio foi otimizada utilizando estruturas de vários canais num suporte construído para o efeito. O estudo da variação de concentração de anticorpo, de OTA-BSA, tempos de incubação e fluxos impostos efetuados, permitiu selecionar as seguintes condições ótimas:

OTA-BSA - concentração de OTA-BSA de 50 µg/mL, 1 minuto de tempo de incubação e fluxo de 10 µl/min

Anti-OTA-HRP - concentração de 2 µg/mL, 3 minutos de tempo de incubação e fluxo de 5µl/min,

O desenvolvimento de um sistema contendo o fotosensor permitiu realizar medidas rápidas com sensibilidades abaixo do limites regulatórios impostos pela Comunidade Europeia (<0.5 ng/ml) em menos de 5 minutos por canal. O imunoensaio otimizado foi também validado para a quantificação de OTA ao limite regulatório de 2 ng/ml em amostras artificialmente contaminadas de vinho tinto, o qual foi previamente tratado com um processo de extração com sais de polietileno glicol (processo descrito na secção 3.3.3.).

Os resultados apresentados são bastante promissores, apontado para uma alternativa viável aos comercialmente disponíveis atualmente para a deteção de micotoxinas, no local de produção. De realçar que, para que tal possa acontecer, ainda têm que ser implementadas melhorias significativas, nomeadamente no que concerne à automação do imunoensaio, de modo a que o tempo que o operador dispensa para realizar o teste seja o mínimo possível ("*hands-on-time*").

É facilmente perceptível a partir da estratégia optada para a deteção de Ocratoxin A que o mesmo equipamento e a mesma metodologia poderá ser facilmente estendida a outras micotoxinas relevantes: fumosinas, aflotoxinas e zearalenona.

A validação do equipamento foi realizada de acordo com o regulamento (EU) nº 519/2014 da comissão de 16 maio de 2014 segundo os métodos de rastreio semi-quantitativos e validação por um único laboratório.

A validação em PBS 7.2 apresentou resultados excepcionais, demonstrando inequivocamente que os ensaios em tampão se consegue confirmar a existência ou não existência de contaminação na STC (50ppb), a grande separação entre os resultados de referência e os controlos positivos permitem obter uma taxa de 0% de falsos positivos e com 95% de certeza afirmar que qualquer valor de razão entre sinal amostra e referência abaixo de 37.8% está contaminado com pelo menos 50 ppb.

Em amostras artificialmente contaminadas o resultado foi idêntico ao obtido em tampão, contudo a separação entre as amostras referencia e as amostras contaminadas com 50 ppb não é tão expressiva, passando o valor limite para 48.4%. O aumento deste valor deve-se possivelmente a alguma interferência da matriz proveniente do processo de extração.

No caso de amostras naturalmente contaminadas com 44 ppb determinou-se que o valor limite situa-se nos 76.9%. Seria de esperar um aumento do valor limite em relação ao estudo anterior uma vez que o STC passou de 50 ppb para 44 ppb, verificou-se uma aproximação entre os resultados referencia e contaminados, aumentando significativamente o desvio padrão associado aos resultados obtidos de 2.6% na matriz artificialmente contaminada para 9.9% nas naturalmente contaminadas, este aumento pode estar relacionado com o facto de uma má homogeneização dos cereais. A subida do valor limite provocou o aparecimento de 8% de possíveis falsos positivos.

Apesar dos valores da validação em amostras naturalmente contaminadas não terem um impacto tão grande como as efetuadas em tampão, a validação permitiu atestar o sucesso no desenvolvimento do equipamento bem como da mudança do tipo de imunoensaio. De realçar que neste caso o estudo foi efetuado para valores 5 vezes abaixo dos limites legais para este tipo de produto, deste modo não restam quaisquer dúvidas sobre a mais-valia deste equipamento para testes semi-quantitativos ao limite legal.

3.6. Referências bibliográficas

- 1 Wild C.P. and Gong Y.Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31, 1 (2010), 71-82.
- 2 Rodrigues I. and Naehrer K. *Mycotoxin Survey Report*. AllAboutFeed, 2013.
- 3 Mahendra Rai and Ajit Varma, eds. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Springer, Berlin, 2010.
- 4 O.O.M. Iheshiolor, O.K. Chuwuka, A.A. Omede, I.C. Okoli, and I.P. Ogbuewu. Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review. *Asian Journal of Animal Sciences*, 5 (2011), 19-33.
- 5 Lachenmeier D.W., Przybylski M.C., and Rehm J. Comparative risk assessment of carcinogens in alcoholic beverages using the margin of exposure approach. *International Journal of Cancer*, 131, 6 (2012), 995-1003.
- 6 Atoui, André El Khoury and Ali. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins*, 2, 4 (2010), 461-493.
- 7 Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C., and Manes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone : an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1 (2007), 1-18.
- 8 R.P., Sharma. Immunotoxicity of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76, 3 (1993), 892-897.
- 9 P. Battilane, N. Magan, and A. Logrieco. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111, Supplement 1 (2006), S2-S4.
- 10 Vladislava M. Soso, Marija M. Skrinjar, and Nevena T. Blagojev. Influence of ecophysiological factors on the presence of ochratoxin A in dried vine fruits: a review. *Acta periodica technologica*, 43 (2012), 123-138.
- 11 P. Battilani, A. Logrieco, and N. Magan. Introductory note. *International Journal of Food Microbiology*, 111, Supplement 1 (2006), S1.
- 12 Egmond H., Schothorst R., and Jonker M. Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1 (2007), 147-157.
- 13 364, Legislação. Regulamento (CE) n. o 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* (2006), 5-24.
- 14 Anfossi L., Giovannoli C., Giraudi G., Biagioli F., Passini C., and Baggiani C. A lateral flow immunoassay for the rapid detection of ochratoxin A in wine and grape must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 46 (2012), 11491-11497.

- 15 Novo P., Moulas G., França Prazeres D.M., Chu V., and Conde J.P. Detection of ochratoxin A in wine and beer by chemiluminescence-based ELISA in microfluidics with integrated photodiodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, B 176 (2013), 232-240.
- 16 Xie S., Chain Y., Yuan Y., Bai L., and Yuan R. Development of an electrochemical method for Ochratoxin A detection based on aptamer and loop-mediated isothermal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 55 (2014), 324-329.
- 17 Yang X., Qian J., Jiang L., Yan Y., Wang K., Liu Q., and Wang K. Ultrasensitive electrochemical aptasensor for ochratoxin A based on two-level cascaded signal amplification strategy. *Bioelectrochemistry*, 96 (2014), 7-13.
- 18 Yao L., Chen Y., Teng J. et al. Integrated platform with magnetic purification and rolling circular amplification for sensitive fluorescent detection of ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 74 (2015), 534-538.
- 19 Lu, L., Wang, M., Liu, L.-J., Leung, C.-H., and Ma, D. Label-Free Luminescent Switch-On Probe for Ochratoxin A Detection Using a G-Quadruplex-Selective Iridium(III) Complex. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 15 (2015), 8313-8318.
- 20 Park, J.H., Byun, J.Y., Mun, H., Shim, W.B., Shim, Y.B., Li, T., and Kim, M.G. A regeneratable, label-free, localized surface plasmon resonance (LSPR) aptasensor for the detection of ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 59 (2014), 321-327.
- 21 Rivas, L., Mayorga-Martinez, C.C., Quesada-Gonzalez, D., Zamora-Galvez, A., de la Escosura-Muniz, A., and Merkoci, A. Label-free impedimetric aptasensor for ochratoxin-A detection using iridium oxide nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 87, 10 (2015), 5167-5172.
- 22 Wang, C., Qian, J., Wang, K., Liu, Q., Dong, X., Wang, C., and Huang, X. Magnetic-fluorescent-targeting multifunctional aptasensor for highly sensitive and one-step rapid detection of ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 68 (2015), 783-790.
- 23 Wang, R., Xiang, Y., Zhou, X., Liu, L.H., and Shi, H. A reusable aptamer-based evanescent wave all-fiber biosensor for highly sensitive detection of Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 66 (2015), 11-18.
- 24 Chen, J., Zhang, X., Cai, S., Wu, D., Chen, M., Wang, S., and Zhang, J. A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver-nanocluster for ochratoxin A detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 57 (2014), 226-231.
- 25 Soares, R.R., Novo, P., Azevedo, A.M., Fernandes, P., Chu, V., Conde, J.P., and Aires-Barros, M.R. Aqueous two-phase systems for enhancing immunoassay sensitivity: simultaneous concentration of mycotoxins and neutralization of matrix interference. *Journal of Chromatography A*, 1361 (2014), 67-76.

- 26 Linzhi Tang and Nae Yoon Lee. A facile route for irreversible bonding of plastic-PDMS hybrid microdevices at room temperature. *Lab on a Chip*, 10 (2010), 1274-1280.
- 27 Kangil Kim, Sin Wook Park, and Sang Sik Yang. The optimization of PDMS-PMMA bonding process using silane primer. *BioChip Journal*, 4, 2 (2010), 148-154.
- 28 Soares, R.R., Novo, P., Azevedo, A.M., Fernandes, P., Aires-Barros, M.R., Chu, V., and Conde, J.P. On-chip sample preparation and analyte quantification using a microfluidic aqueous two-phase extraction coupled with an immunoassay. *Lab on a chip*, 14, 21 (2014), 4284-4294.
- 29 Crowther J.R. *The Elisa Guidebook*. Human Press, 2001.
- 30 Zezza, F., Longobardi, F., Pascale, M., Eremin, S.A., and Visconti, A. Fluorescence polarization immunoassay for rapid screening of ochratoxin A in red wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 5 (2009), 1317-1323.
- 31 Stroka, C. von Holst J. Performace criteria for rapid screening methods to detect mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 7, 4 (2014).
- 32 L147/29. Regulanto que altera o (CE) n.o 401/2006 no que se refere aos métodos de amostragem de lotes grandes, especiarias e suplementos alimentares, aos critérios de desempenho para as toxinas T-2 e HT-2 e a citrinina e aos métodos de análise de rastreio. *Jornal Oficial da União Europeia* (Maio 16, 2014). (EU nº 519/2014).
- 33 L229/7. Recomendação sobre a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal. *Jornal Oficial da União Europeia* (Agosto 17, 2006). (2006/576/CE).
- 34 Wild, David. *The immunoassay handbook*. Elsevier Science, 2013.
- 35 Ng, Alphonsus H. C., Uddayasankar, Uvaraj, and Wheeler, Aaron R. Immunoassays in microfluidic systems (2010), 991–1007.
- 36 Adam Bange, H. Brian Halsall, William R. Heineman. Microfluidic immunosensor systems (2005), 2488–2503.
- 37 Thorsten Verch, Ray Bakhtiar. Miniaturized immunoassays: moving beyond (2012), 177–188.

Capítulo 4

Desenvolvimento de um sistema de
quantificação de azoto assimilável em
vinho

4.1 Resumo

O azoto presente no sumo de uva ou no mosto em fermentação é um elemento chave para o crescimento e metabolismo das leveduras ao longo do processo de fermentação, contudo nem todos os compostos contendo azoto influenciam o processo fermentativo e os que realmente interessam quantificar são os que se comportam como nutrientes para as leveduras durante o processo de fermentação alcoólica (denominado por azoto assimilável). O azoto assimilável encontra-se maioritariamente na forma de aminoácidos e iões amónio. A presença destes compostos em baixas concentrações (inferiores a 140 mg N/L) pode limitar o crescimento das leveduras provocando uma fermentação alcoólica lenta ou em casos mais extremos parar mesmo a fermentação (fermentação amuada), pelo contrário em excesso estes compostos provocam instabilidade microbiológica, baixa eficiência de fermentação e produção de compostos indesejáveis como sulfuretos ou carbamato de etilo. Estas razões fazem com que seja necessário processos de quantificação de azoto assimilável o que implica a construção de sistemas de quantificação fáceis de usar, de resposta rápida e fiáveis.

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de dois métodos distintos para a deteção de azoto assimilável em vinho. A primeira parte consistiu na contribuição para o projeto “Bionitro - Biossensor Potenciométrico para deteção de iões amónio e L-Amino ácidos no vinho” com o desenvolvimento de um eletrodo de pH em estado sólido e de um eletrodo seletivo de iões amónio também em estado sólido. O segundo trabalho consistiu no desenvolvimento de um método de quantificação de azoto assimilável com base na plataforma ótica propriedade da empresa Lumisense, Lda.

Para o projeto Bionitro o eletrodo de pH de estado sólido, foi desenvolvido com base no crescimento eletroquímico de um filme de óxido de irídio, e sua otimização. Foi desenvolvido também um eletrodo seletivo de iões amónio, por deposição de solução de membrana seletiva de iões à superfície de eletrodo apresentando boa linearidade com $\log [\text{NH}_4^+]$, tendo sido testados também a incorporação de dois condutores mistos entre a membrana e o eletrodo, óxido de irídio e polipirrolo.

O desenvolvimento para a quantificação de azoto assimilável consiste na junção de duas técnicas, uma técnica para quantificar aminoácidos assimiláveis e outra para iões amónio. Ambos os processos consistem na aquisição de sinal de fluorescência emitidos por isoindolos formados na reação entre aminas primárias com o-ftaldeído (OPA) e um agente redutor. Para a quantificação de aminoácidos utilizou-se o sistema aminoácido com amina primária-oftaldeído/N-acetil-L-cisteína enquanto para a determinação de iões amónio o sistema NH_4^+ - oftaldeído $-\text{SO}_3^{2-}$.

O ensaio otimizado para a quantificação de aminoácidos assimiláveis tem duração de 12 minutos e utiliza 1 μL de amostra, revelando uma gama de linearidade entre 25 e 190 mg/L.

O ensaio otimizado para a quantificação de iões amónio tem a duração de 10 minutos, gama de quantificação entre 8 e 48 ng de iões amónio com somente 1 μL de amostra.

A aplicabilidade da técnica desenvolvida para a quantificação de iões amónio sem alteração do equipamento e sem material biológico, reação química, em detrimento do

ensaio enzimático comum é de extrema relevância para a empresa que se procura situar no mercado da quantificação de parâmetros inerentes à indústria vinícola.

4.2 Introdução

Os métodos de análise para caracterização do vinho baseiam-se, de uma forma geral, em métodos de análise de físico-química clássica, mas assiste-se, atualmente, a um crescente desenvolvimento de métodos instrumentais de análise com uma focalização nos métodos de análise que respondam às exigências da qualidade e fiabilidade necessárias (adequação ao uso), que tenham associados uma maior rapidez na resposta, uma maior segurança, um menor custo, a possibilidade de automatização e que sejam menos poluentes.

4.2.1 Importância da determinação de azoto assimilável

O azoto (N) presente no sumo de uva ou no mosto é um nutriente essencial para o crescimento e metabolismo das leveduras, e fundamental para o seu bom desempenho fermentativo. A presença de compostos contendo azoto para além de interferirem no processo fermentativo são também responsáveis por alteração de aroma e composição química final do vinho, por este motivo a sua determinação, na indústria vinícola, revela-se de extrema importância.

Existe um grande número de compostos azotados presentes na uva, tais como o NH_4^+ , aminoácidos, proteínas, vitaminas, péptidos, amins e NO_3 .

A concentração inicial de N nas uvas e a concentração de cada um dos diferentes constituintes azotados afetam o crescimento das leveduras, a velocidade de fermentação, formação, a estabilidade do produto final e a clarificação, além de influenciarem o desenvolvimento do aroma e do "*bouquet*" do vinho. De realçar que a concentração de N nas uvas também varia consideravelmente de acordo com a casta, clima, solo, e as práticas enológicas.

A quantidade de azoto presente pode variar entre os 60 e os 2400 mg/L, sendo globalmente aceite que, por forma às leveduras realizarem a fermentação sem que ocorram amuos ou paragens de fermentação, esta concentração não deverá ser inferior a 140 mg N/L [1] [2]. Em oposição, um excesso destes compostos provoca instabilidade microbiológica, baixa eficiência de fermentação e produção de compostos indesejáveis como sulfuretos ou carbamato de etilo [3].

Nem todos os compostos azotados são assimilados pelas leveduras, e na prática apenas os que são nutrientes tem interesse em se quantificar de forma rotineira. Desta forma neste grupo encontra-se o azoto amoniacal (NH_4^+) e os aminoácidos primários com exceção da prolina.

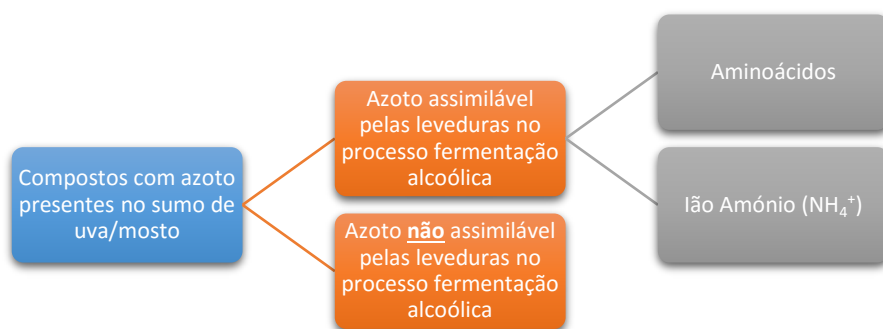


Figura 4.1 – Ilustração dos compostos com azoto presentes no sumo de uva/mosto, mostrando os que se apresentam como de grande importância na indústria vitivinícola.

4.2.2 Estado da arte na determinação de azoto assimilável

A importância da deteção destes grupo de compostos é evidente, estando pois disponíveis alguns métodos de quantificação dos mesmos. A técnica mais precisa e fiável [4] é a quantificação recorrendo à técnica de HPLC com deteção por fluorescência [5], contudo não é um instrumento usual numa adega, estando somente disponível em laboratórios de análises, tornando o processo dispendioso e moroso. Deste modo justifica-se a implementação de métodos rápidos e fiáveis para a quantificação de azoto assimilável.

Existem somente dois métodos de quantificação de azoto assimilável total num só passo, a titulação formol (método de Sorenson) baseado na reação de formaldeído com aminoácidos e iões amónio [6] [7] [8] [9], e o método de FTIR [10] [11]. Contudo por combinação de técnicas é possível a quantificação de azoto total, utilizando uma para a determinação de aminoácidos primários e outra para iões amónio.

Para a quantificação de aminoácidos é possível utilizar o método NOPA (*nitrogen by OPA*) baseado na derivatização dos grupos amina primários com o reagente o-ftaldeído/N-acetil-L-cisteína (OPA/NAC) [12] [9], o método colorimétrico, baseado na reação da ninidrina com os aminoácidos [7] [6], enquanto que para a quantificação de iões amónio é possível utilizar o elétrodo seletivo de iões ou um método enzimático baseado na atividade da glutamato desidrogenase na conversão de 2-Oxoglutarato em L-glutamato [13].

Uma descrição mais em detalhe sobre os procedimentos envolvidos em cada uma das diferentes técnicas analíticas é apresentada em seguida.

Métodos para quantificação de azoto assimilável recorrendo a uma única técnica

Titulação de Formol ou método de Sorenson

O formaldeído reage com o azoto aminado e com o azoto amoniacal bloqueando a sua função amina, originando um grupo metilo que contém a função carboxilo dos aminoácidos [6] [14] [8]. A reação causa a perda de um protão do NH_4^+ , protão esse que depois de libertado pode então ser titulado com o NaOH. O NH_4^+ ao ser bloqueado pelo formaldeído, e os seus sais titulados com NaOH, faz com que seja possível através deste método, a quantificação do N aminado e do N amoniacal. O método da titulação com formol segundo a literatura [8] [9] permite recuperar 90 a 98% da maioria dos aminoácidos (com exceção da prolina que se fica pelos 17%) e 77-88% de iões amónio.

O método é simples de realizar e requer poucos reagentes contudo a grande desvantagem inerente a esta técnica é a elevada toxicidade do formaldeído e segundo a regulamentação do programa REACH (2006) existe um desencorajamento do uso de técnica com solventes tóxicos em detrimentos de técnicas mais limpas.

Método FTIR

A espectrometria de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-MIR usualmente FTIR) baseia-se na medição das frequências de ligações químicas em grupos funcionais, tais como C-C, C-H, O-H, C-O e N-H, mediante a absorção da radiação na região do infravermelho médio, usualmente referenciada com número de onda entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , ou definindo em comprimento de onda, entre 2500nm e 25000nm.

Este método pode ser usado para identificar um composto ou identificar a composição de uma amostra. Baseia-se no facto de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências específicas de vibração que correspondem aos níveis de energia da molécula (níveis de vibração) [15]. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, da massa dos átomos e do acoplamento vibratório. É de salientar que nesta região do espectro a energia dos fotões não é suficiente para excitar os eletrões, porém, alteram o estado vibracional dos átomos e dos grupos ligados por meio de ligações covalentes [16].

Esta técnica apresenta como vantagem o facto de utilizar quantidades mínimas de amostra, ser uma técnica não destrutiva, não produzir resíduos tóxicos além de permitir deteções qualitativas e quantitativas, bem como possibilita a análise de vários parâmetros em simultâneo num curto espaço de tempo [17]. FTIR demonstra ser uma técnica promissora na área de controlo de qualidade e monitorização dos diversos processos de vinificação. Contudo esta técnica apresenta desvantagens consideráveis como o elevado custo inicial na aquisição do equipamento e pelo facto de não ser uma técnica de análise absoluta necessita de calibração utilizando métodos validados.

A fiabilidade dos resultados analíticos está diretamente relacionada com a representatividade do conjunto de amostras relativamente ao universo em estudo.

Desta forma, uma amostragem representativa, equilibrada e bem proporcionada é fundamental para a obtenção de resultados fiáveis, tal como demonstra a literatura [18]. A forte influência da matriz relacionada com as diferentes castas, cor ou localização geográfica são toleradas por calibrações bem elaboradas e robustas como é sugerido numa Resolução da Organização internacional do vinho (OIV 390/2010). Desta forma a boa calibração e robustez da mesma é uma forte preocupação para os utilizadores do método FTIR.

Métodos combinados para quantificação de azoto assimilável

Quantificação de aminoácidos primários

- NOPA

Este método de deteção de aminoácidos primários em vinho foi desenvolvido em 1998 por Dukes e Butzkle [12] e baseia-se na reação existente entre OPA, NAC e aminoácidos com aminas primárias. Da derivatização da amina primária dos aminoácidos com o reagente OPA/NAC resulta a formação de um isoindolo que apresenta um pico de absorção a 335 nm permitindo assim a sua quantificação por técnicas espectrofotométricas. Esta técnica demonstra boa especificidade pois somente forma o isoindolo com aminoácidos que contenham aminas primárias, não formando com o ião amónio nem com a prolina.

A reação química principal desta técnica é apresentada na seguinte figura.

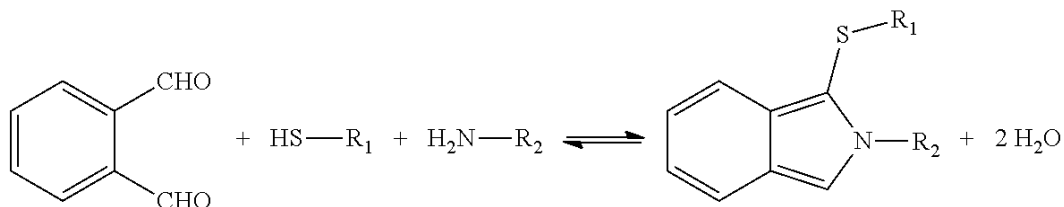


Figura 4.2 – Reação química de formação do isoíndole resultante da reação entre OPA um tiol e amina primária.

Neste caso em concreto o tiol utilizado foi o, N-acetil-L-cisteína (NAC), Figura 4.3, pois demonstrou vantagens em relação a outros utilizados, sendo a mais importante uma maior estabilidade nos isoindolos formados.

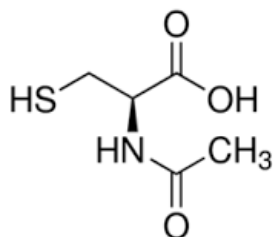


Figura 4.3 – Estrutura química do NAC, N-acetil-L-cisteína .

Os isoíndolos resultantes da técnica de NOPA, apresentam uma vantagem adicional, quando expostos a luz no pico de absorção, 335nm, emitem sinal de fluorescência a 451 nm apresentando alguma dependência com o tipo de aminoácido que levou à formação do isoíndolo. Esta reação foi reportada para a quantificação recorrendo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e detecção por fluorescência [5].

Como resultado da especificidade desta reação para aminoácidos primários, o aminoácido prolina não pode ser derivatizado sendo uma vantagem adicional uma vez que também não é assimilável pelas leveduras. Por outro lado devido à especificidade da reação para os aminoácidos alfa este método não contabiliza a contribuição das cadeias laterais do aminoácido L-arginina.

- Ninidrina

Outro método de detecção de aminoácidos primários consiste na separação dos mesmos recorrendo a cromatografia de troca iónica seguido da sua derivatização fazendo-os reagir com ninidrina.

Quando os aminoácidos que contêm uma amina primária reagem, Figura 4.4, com 2 equivalentes de ninidrina e formam um composto azulado que mediante as condições apropriadas é proporcional à concentração de aminoácidos primários.

A sua quantificação é efetuada recorrendo a técnicas espectrofotométricas, medindo a absorvância do composto a 570 nm.

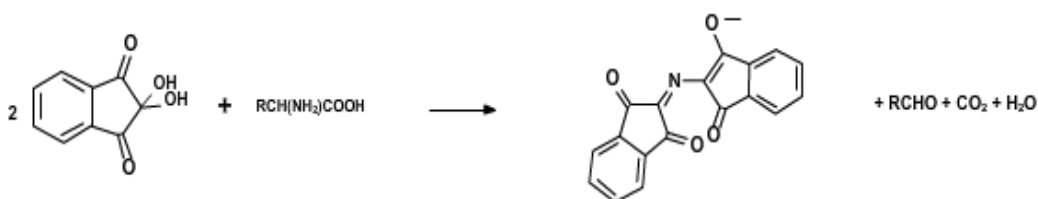


Figura 4.4 – Reação química entre a ninidrina e uma amina primária.

Apesar de este método ter demonstrado ser um método de confiança e ter um excelente poder de resolução, é um método muito moroso, a sua sensibilidade é baixa, o seu manuseamento é difícil e exige muita manutenção. Para além disso ainda exige uma longa preparação da amostra, e a sua utilização em vinhos não permite a quantificação da cisteína [19].

Quantificação de Iões amónio

- Elétrodo seletivo de iões

O elétrodo seletivo de iões (ISE) de amónio é uma técnica usual de quantificação de iões amónio em soluções. O funcionamento desta técnica é baseado no mesmo princípio que um elétrodo de pH. A figura seguinte ilustra o interior de um elétrodo seletivo de iões.

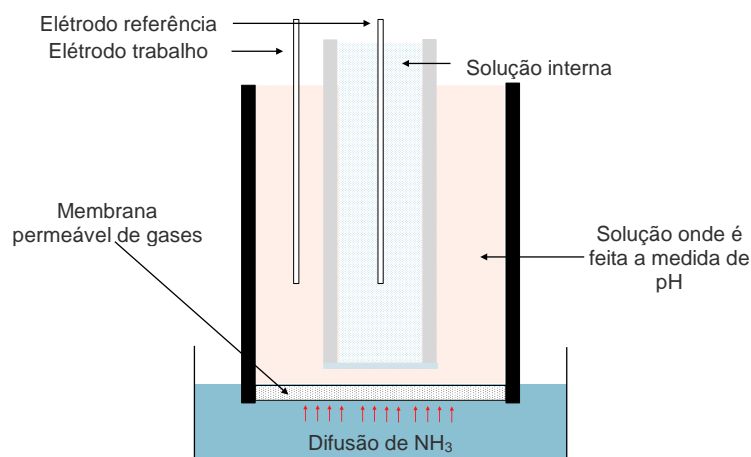


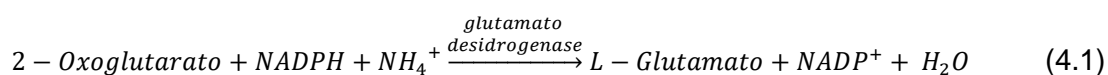
Figura 4.5 – Ilustração de um eletrodo seletivo de íons (ISE) de amônio.

O ISE é imerso na solução onde se pretende determinar a concentração de íons amônio, na Figura 4.5 ilustrada em cor azul, essa solução é composta pela amostra de medida e uma solução de pH superior a 11 de modo a garantir que todo o íon amônio é libertado na fase gasosa (NH_3). O amoníaco na fase gasosa difunde-se através da membrana permeável de gases e faz alterar o pH da solução de medida, a diferença de pH nessa solução é medida pela variação do potencial entre os dois eletrodos. Recorrendo a uma curva de calibração previamente realizada é possível quantificar a quantidade total de íons amônio na solução original.

A técnica apresenta como vantagem a fácil utilização e procedimento de uso mas em contrapartida requer tempo do utilizador de modo a proceder às curvas de calibração necessárias - pré ensaio, e as mesmas devem ser repetidas para utilizações superiores a 2 horas.

- Método Enzimático

O método enzimático para quantificação de íons amônio descrito por Bergmeyer e Beutler 1985 [20], baseado na atividade do glutamato desidrogenase, continua a ser utilizado como método de medida rápido e fiável. O seu funcionamento baseia-se na reação de íons amônio com o 2-oxoglutarato na presença de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) formando L-glutamato e NADP^+ , descrito na reação seguinte.



O NADPH apresenta um pico de absorção aos 340 nm, e o consumo do mesmo na reação permite quantificar íons amônio, visto reagirem estequiometricamente. O decréscimo da absorvância a 340 nm é proporcional à quantidade de íons amônio.

Vários kits comerciais estão presentes no mercado utilizando esta técnica, onde o cliente somente tem que ter acesso a um espectrofotómetro para realizar a medida.

4.2.3 Eléktrodo de pH de estado sólido

A medição do valor de pH de uma amostra de vinho, é de extrema importância no controlo da qualidade e de produção e é usualmente efetuado recorrendo a um eléctrodo de vidro. Uma das principais razões para a medição do pH do vinho prende-se com a estabilidade microbiológica do mesmo. Muitos dos microrganismos que poderão levar a uma degradação do vinho crescem preferencialmente em condições de pH elevadas. O seu crescimento é também dependente da capacidade antisséptica demonstrada pelo dióxido de enxofre presente. Esta capacidade é não só função da quantidade de SO₂ presente mas também do pH da solução, sendo menor à medida que o pH é superior.

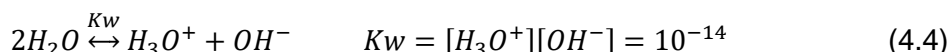
No geral o pH é utilizado para especificar o nível de acidez ou basicidade de uma solução aquosa. Inicialmente o pH foi definido como sendo o negativo do logaritmo da concentração de iões H⁺, de modo a simplificar o uso de concentrações bastante reduzidas (na ordem de 10⁻⁷ mol/L) usualmente encontradas na natureza, a definição é expressa pela seguinte equação:

$$pH = -\log[H^+] \quad (4.2)$$

Com maior entendimento sobre solutos iónicos em solução, foi reconhecido que as técnicas de medida utilizadas para determinar a concentração de iões H⁺ de facto medem a atividade do ião H⁺, geralmente referenciada como “concentração efetiva”. Este facto levou à adoção de uma definição mais rigorosa, e sendo definido de acordo com a IUPAC [21] [22] como o negativo do logaritmo da atividade H⁺ em solução, representado pela seguinte expressão:

$$pH = -\log a_{H^+} = -\log \gamma[H^+] \quad (4.3)$$

Onde a_{H^+} é a atividade do ião H⁺ e γ o coeficiente de actividade. As duas expressões são equivalentes em soluções diluídas onde a concentração e a actividade são praticamente iguais. Na prática, as medições de rotina não tem em conta a atividade dos iões H⁺ mas sim determinação por comparação com padrão estáveis de pH conhecido. Por exemplo, em água na ausência de outros compostos químicos que alterem o equilíbrio a concentração de iões H⁺ é de 10⁻⁷ M e a concentração de iões OH⁻ de 10⁻⁷ M a 25°C.



Nestas condições e segundo descrito anteriormente o pH da água é 7, neutro. A adição de ácidos ou bases aumenta ou diminui a atividade do ião H⁺, respetivamente permitindo determinar essa variação.

A medição do pH revela-se muito importante em diversas áreas como clínica, ambiental e na indústria alimentar. Normalmente para a monitorização de tais valores o eléctrodo mais utilizado é o eléctrodo de vidro pois apresenta boa estabilidade, tempo de vida longo e resultados fiáveis, contudo apresentam desvantagens tais como o custo, dificuldade de miniaturizar e consequente dificuldade de utilizar em circuitos de microfluídica. Por estas razões a maioria dos eléctrodos de pH disponíveis comercialmente são considerados de tamanho macro com diâmetros de cerca de 15 mm e como tal não são indicados para medições de pequenos volumes, tal como em sistemas miniaturizados.

Deste modo e para tentar colmatar as lacunas apresentadas pelos anteriores foram desenvolvidos sensores de pH em estado sólido que consistem em filmes poliméricos [23] ou óxidos metálicos [24]. Destes, os óxidos metálicos foram os que obtiveram maior interesse por parte de investigadores devido às suas vantagens como facilidade de miniaturização e adaptação a ambientes extremos. Existem diferentes técnicas de fabrico destes materiais, tais como, eletrodeposição [25] [26], técnica de impressão serigráfica (*screen-printing*) [27] [28] e vaporização catódica [29] [30]. Os elétrodos fabricados por eletrodeposição apresentam um filme amorfo com diferentes níveis de hidratação e com elevada microporosidade interna [31]. Os produzidos através da técnica de impressão serigráfica apresentam vantagens económicas devido à facilidade de fabricação e baixo custo [32], ideais para sensores descartáveis contudo não é possível o uso de qualquer metal. Os construídos por vaporização catódica apresentam elevada estabilidade química [33] e esta técnica é certamente o método de fabrico mais estudado e utilizado na indústria [34] [35] [36].

4.2.4 Enquadramento do trabalho efetuado na determinação de azoto assimilável

Este trabalho foi realizado temporalmente em partes distintas do percurso académico do doutoramento.

Bionitro consistiu num projeto de co-promoção liderado pela empresa Lumisense Lda, e aprovado pela Agência de Inovação com o objetivo do desenvolvimento e construção de um protótipo de um biossensor potenciométrico e ótico para a determinação rápida do conteúdo de azoto assimilável no mosto e no vinho.

O objetivo tecnológico consistia em demonstrar que era possível a utilização de um elétrodo seletivo para a quantificação de iões amónio em amostras de vinho assim como demonstrar a possibilidade da aplicação da enzima L-amino oxidase para a quantificação dos aminoácidos livres. A conjugação de ambos os métodos permite a quantificação do azoto assimilável presente na amostra (iões amónio livre + aminoácidos presentes).

Na figura seguinte está representado de forma esquemática o processo proposto no projeto para a quantificação dos L-aminoácidos presentes em amostras de vinho:

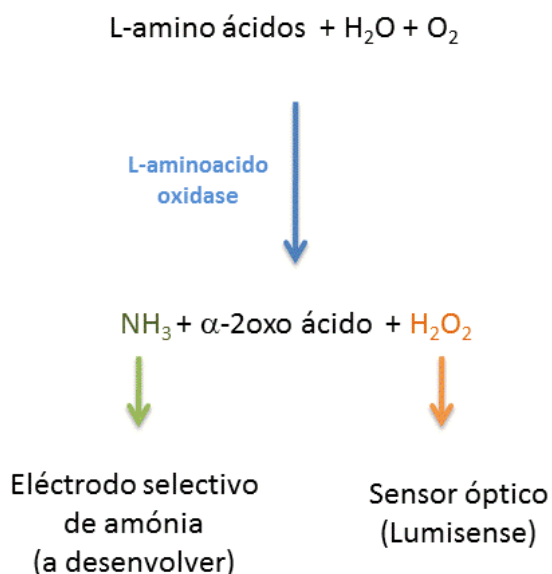


Figura 4.6 – Esquema representativo do processo proposto de quantificação dos L-aminoácidos presentes no vinho.

O contributo dado englobado no projeto de doutoramento consistiu no desenvolvimento de um elétrodo de pH de estado sólido bem como um elétrodo seletivo de iões amónio de estado sólido.

Após algum tempo a empresa sentiu necessidade de desenvolvimento de um método mais eficaz e rápido para a deteção destes compostos. Com recurso ao equipamento já desenvolvido pela empresa para deteção de outros compostos e adaptando alguns componentes foi possível desenvolver um método para a determinação da quantidade de azoto assimilável recorrendo a duas medições diferentes: quantificação de aminoácidos primários e quantificação de iões amónio, descritos neste capítulo.

Em suma o desenvolvimento de um elétrodo de pH e elétrodo seletivo de iões amónio de estado solido foram desenvolvidos no âmbito da execução do projeto Bionitro, sendo o desenvolvimento das técnicas de quantificação de aminoácidos primários e iões amónio ao abrigo do desenvolvimento do equipamento Enosense® da empresa Lumisense, Lda.

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Equipamentos, células eletroquímicas e eletrodos de trabalho

As medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV/Vis da marca UNICAM modelo UV2 conectado a um computador com um programa da marca como interface, Vision V3.32.

Os ensaios de eletroquímica convencional foram realizados utilizando um potenciostato modelo Parstat 2253 da empresa *Princeton Applied Research (PAR)*. Para visualização e gravação dos dados usou-se o programa PowerSuite da PAR. Para os ensaios utilizaram-se células convencionais de vidro de três eletrodos, sendo eletrodo de referência o eletrodo saturado de calomelanos (SCE) e como eletrodo de auxiliar uma folha de platina. O eletrodo de trabalho utilizado é de Au policristalino da empresa CHI Instruments, realizando-se antes de cada ensaio o seguinte procedimento de limpeza: o eletrodo é polido num pano de polimento com suspensão de alumina com granulidade decrescente de 1 e 0.3 μm . Após polimento, o eletrodo é sempre, antes de qualquer experiência, sujeito a limpeza eletroquímica por varrimento de potencial entre -200 e $+1500$ mV vs. SCE numa solução 0.5 mol.dm^{-3} de H_2SO_4 até à obtenção de um voltamograma típico de um eletrodo de ouro policristalino limpo em meio ácido apresentado na Figura 4.7. O eletrodo de trabalho tem uma área de $0,0314 \text{ cm}^2$.

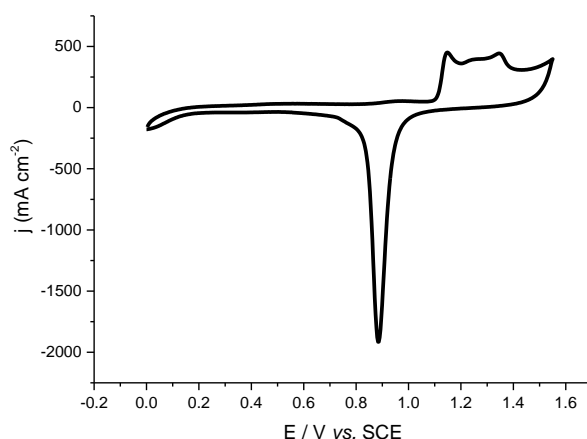


Figura 4.7 – Voltamograma cíclico de um eletrodo de ouro policristalino em 0.5M de H_2SO_4 entre 0 e 1.55V vs SCE com velocidade de varrimento de 100 mV/s .

4.3.2 Reagentes e soluções

Tabela 4.1 – Reagentes utilizados ao longo do estudo com respetivo número CAS, fornecedor e grau de pureza.

Reagente	Número CAS	Marca
Cloreto de sódio	7647-14-5	Aldrich (99.5%)
Cloreto de potássio	7447-40-7	Aldrich (99.5%)
Dihidrogenofosfato de potássio	7778-77-0	Merk (99.5%)

Dihidrogenofosfato de sódio	7558-80-7	Aldrich (99%)
Fosfato de sódio dibásico	7558-79-4	Aldrich (99%)
Fosfato de potássio dibásico	7758-11-4	Aldrich (98%)
Hidrogeno ftalato de potássio	877-24-7	Aldrich (99%)
Carbonato potássio anidro	584-08-7	Aldrich (99%)
Trisaminometano (Tris)	77-86-1	Acros (+99%)
Tetraborato de sódio	1330-43-4	Aldrich (99%)
Ácido Sulfúrico	7664-93-9	Aldrich (97.5%)
Tetracloreto de irídio	207399-11-9	Aldrich (99.9%)
Tetrahidrofurano	109-99-9	Aldrich (99.9%)
Policloreto de vinil	9002-86-2	Aldrich (-----)
Ácido oxálico dihidratado	6153-56-6	Aldrich (99%)
Dibutil sebacate	109-43-3	Aldrich (97%)
Nonactin	6833-84-7	Aldrich (95%)

Para os ensaios de determinação de iões amónio e aminoácidos primários foram utilizados vinhos de referências destinados a laboratórios de referência (TITRIVIN¹). Este tipo de material de referência exibe um certificado de análise para diversos parâmetros, tais como pH, % de álcool, glucose + frutose entre outros, tendo os modelos utilizados sido: AA1, AA2, AA3 e AA4, cujos parâmetros se apresentam na tabela seguinte:

Tabela 4.2 – Valores de referência certificados de diferentes parâmetros para os diferentes vinhos utilizados.

Parâmetros	AA1	AA2	AA3	AA4
	(Lot A 030712121)	(Lot A 030612112)	(Lot A 030712123)	(Lot A 030712124)
Título alcoométrico (vol%)	9.46 ± 0.04	11.02 ± 0.04	12.56 ± 0.04	13.75 ± 0.05
Açúcares redutores (g/L)	1.77 ± 0.14	5.10 ± 0.25	6.88 ± 0.25	9.26 ± 0.37
Glicose + Frutose (g/L)	0.67 ± 0.05	3.81 ± 0.09	5.87 ± 0.22	8.26 ± 0.28
Acidez Total (g H ₂ SO ₄ /L)	2.70 ± 0.05	3.56 ± 0.05	4.70 ± 0.06	5.73 ± 0.07
pH	3.66 ± 0.02	3.22 ± 0.02	3.03 ± 0.02	2.83 ± 0.02
Acidez Volátil (g H ₂ SO ₄ /L)	0.21 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.60 ± 0.02
Ácido Acético (g/L)	0.23 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.57 ± 0.03	0.69 ± 0.05
Ácido L-Málico (g/L)	0.16 ± 0.02	0.77 ± 0.05	2.52 ± 0.09	3.25 ± 0.16
Ácido L-Láctico (g/L)	1.41 ± 0.09	-----	-----	0.19 ± 0.04

¹ www.titrivin.com

Preparação de tampões utilizados

Tampão fosfato salino pH 7.2 (PBS 7.2)

Para um balão de 100 mL pesar:

- 0.8 g (136mM) de cloreto de sódio (NaCl)
- 0.02 g (2.6mM) de cloreto de potássio (KCl)
- 0.144 g (10mM) de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)
- 0.024 g de (1.7mM) dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

Perfazer o volume com água desionizada, medir o pH e acertar com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Tampão universal

Para um balão de 100 mL pesar:

- 0.102 g (5mM) de hidrogeno ftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$)
- 0.068 g (5mM) de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
- 0.060 g (5mM) de trisaminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)
- 0.050 g (2.5mM) de tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)
- 0.584 g (100mM) de cloreto de sódio

Perfazer o volume com água desionizada, medir o pH e acertar com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

4.3.3 Síntese da membrana seletiva de íões amônio

A preparação da membrana e sua deposição à superfície do eletrodo decorreu de acordo com o seguinte procedimento otimizado, adaptado de Meyerhoff [37]:

- 65 mg de PVC, 1 mg de Nonactin, 125 ml de dibutil sebecate e 1.5 ml de tetrahidrofurano (THF) foram misturados vigorosamente num *vortex* e 200 μl desta solução depositada num eletrodo de ouro de 2 mm de diâmetro. Após secagem da membrana o eletrodo modificado com a membrana é imerso em solução de 0.1 M NH_4Cl por um período compreendido entre 12 a 24 horas como pré-condicionamento e para realizar o processo de hidratação.

4.3.4 Preparação da solução para deposição de óxido de irídio

A solução para a eletrodeposição de filmes de IrO_x foi preparada de acordo com o seguinte procedimentos adaptado de Yamanaka [38]:

- 75 mg de tetracloreto de irídio foram dissolvidos em 50 ml de água. A solução é agitada durante 30 minutos. Uma alíquota de 0.5 ml de solução aquosa de H_2O_2 a 30 % é adicionada seguido de agitação suplementar por mais 10 minutos. 250 mg de ácido oxálico dihidratado é então adicionado e a solução

é agitada novamente por mais um período de 10 minutos. O pH da solução é ajustado para 10.5 com a adição de pequenas porções de carbonato de potássio anidro. A solução final repousa durante 48 horas antes de ser usada no processo de eletrodeposição.

A solução de irídio é guardada no frigorífico e pode ser usada num espaço temporal de várias semanas. Todos os filmes foram preparados a partir de soluções a 5 °C, uma vez que a eletrodeposição a temperaturas baixas aumenta ligeiramente a eficiência do processo [39].

4.4 Resultados

4.4.1 Fabricação e aplicação de um eléctrodo de pH de estado sólido

Como referido na introdução existe necessidade de miniaturizar os eléctrodos de pH e uma das formas de reduzir o seu tamanho consiste na remoção da solução interna de referência, isto é, colocar uma membrana iónica condutora em contacto direto com o condutor eletrónico. Assim sendo, alternativas para eléctrodos de vidro são óxidos metálicos tais como SnO_2 e IrO_x [40]. Estes eléctrodos respondem muito mais rapidamente que os de vidro, apresentam menor custos de produção, são mecanicamente mais robusto, e toleram operações em ambientes extremos.

Após uma revisão da literatura sobre a aplicação de óxidos mistos na construção de eléctrodos de pH verificou-se que os estudos iniciais incluíam o Sb_2O_3 e Bi_2O_3 os quais provaram ser bastante úteis em soluções interditas a eléctrodos de vidro, incluindo soluções de HF e de KOH concentradas [41]. Estes sistemas no entanto eram suscetíveis a instabilidades na resposta do sensor, resultando em aplicações industriais muito limitadas. Eléctrodos de Pd/PdO revestidos a Nafion também foram usados para monitorizar o pH do sangue [42].

Como resultado de um estudo sistemático, a tabela seguinte, apresenta uma compilação dos diferentes óxidos metálicos reportados para produção de eléctrodos de pH de estado sólido onde são apresentadas as principais características [43].

Tabela 4.3 – Características dos óxidos metálicos como eléctrodos de pH.

Material de eléctrodo	Sensibilidade (mV/pH)	Intervalo de pH recomendado	Precisão (\pm mV)	Histerese pH 2-12-2; (mV)	Interferentes redox (mV)	Outros interferentes
TiO_2	-55	2-12	15	30	100	F^-
RuO_2	-61.8	2-12	2	9	100	I^-
$\text{RhO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	-68.2	2-12	1	20	400	Br^- , I^-
SnO_2	-46.6	-	65	75		
Ta_2O_5	-49.3	3-10	30	50	70	F^- , I^-
$\text{OsO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-51.2	2-11	15	25	200	
IrO_x	-59.8	2-10	2	25	20	Cl^- , Br^- , I^-
PtO_2	-46.7	5-10	4	100	100	I^-

Segundo a equação de Nernst uma sensibilidade de -59.2 mV/pH é esperada para um sistema bem comportado. De acordo com a tabela anterior o óxido metálico que apresenta um valor mais próximo é o IrO_x com uma resposta de 59.8 mV/pH.

O fator decisivo a favor do IrO_x , e que explica a elevada quantidade de investigação dedicada a este material, é que para além da resposta Nerstiniana apresenta uma limitada suscetibilidade a interferentes redox, ± 20 mV.

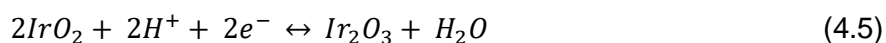
Eléttodos de óxido de irídio

Os eléctrodos de óxidos de irídio foram bastantes investigados ao longo dos anos, e as suas vantagens em relação ao eléctrodo convencional de vidro ou de outros óxidos metálicos foram demonstradas apresentando boa estabilidade num grande intervalo de medida de pH, a altas temperaturas, altas pressões em ambientes agressivos e mesmo demonstrando resposta rápida em soluções não aquosas [44]. Os óxidos de irídio para além de serem utilizados como eléctrodos de pH também são utilizados como material de ânodo nas reacções de evolução de oxigénio e cloro [45] [46] [47] e como material electrocrómico [48]. Para todas estas aplicações as características dos filmes de óxido de irídio são bastante dependentes do método e condições de fabricação dos óxidos, determinantes na sua estrutura e composição. Os métodos de fabricação de filmes de óxidos de irídio mais comuns são: crescimento eletroquímico, eletrodeposição e pulverização catódica [49].

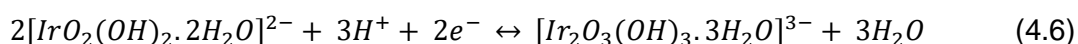
O crescimento eletroquímico é realizado quando o material de eléctrodo é composto por irídio e à sua superfície se produz um óxido através da activação eletroquímica num determinado eletrólito. Quando é pretendido utilizar filmes de óxido de irídio sem que o material de suporte a utilizar seja necessariamente irídio, utiliza-se a técnica de eletrodeposição de filmes de óxido de irídio em diversos substratos como carbono vítreo, platina, ouro entre outros. Outra técnica de fabricação de eléctrodos é a pulverização catódica, em que o irídio metálico é pulverizado em determinados substratos de modo a formar um filme, diferentes condições de pulverização catódica resultam em filmes apresentando diferentes características.

Na prática a grande utilidade de sensores de pH baseados em óxidos de irídio reside no facto de o mecanismo de resposta potenciométrica ao pH para estes eléctrodos ser fundamentalmente distinto do obtido com eléctrodos seletivos tradicionais.

Para a maioria destes sistemas (e.g. eléctrodo de pH de vidro) o potencial é gerado na interface solução/eléttrodo e depende essencialmente das actividades do ião relevante na fase em solução. Para o caso de eléctrodos baseados em óxidos metálicos, a resposta ao pH depende não só da actividade do protão mas também do estado de oxidação do filme de irídio, sendo que os equilíbrios envolvidos descritos por:



para um eléctrodo anidro, e



para um sistema de IrO_x hidratado.

Assim sendo, eléctrodos preparados em diferentes condições e metodologias a resposta Nernstiana pode variar num intervalo entre 59 e 88 mV/pH. Eléttrodos que exibem declives intermédios (60-70 mV/pH) são usualmente descritos como contendo uma composição mista de óxidos de irídio, IrO_x , operando consequentemente num mecanismo de reacções mistas.

Se considerarmos as equações de Nerst, e.x.

$$E = E^\circ - \frac{2.3RT}{2F} \log \frac{[Ir_2O_3]}{[IrO_2]^2[H^+]^2} \quad (4.7)$$

$$E = E^\circ - \frac{2.3RT}{2F} \log \frac{[(Ir_2O_3(OH)_3 \cdot 3H_2O)^{3-}]}{[(IrO_2(OH)_2 \cdot 2H_2O)^{2-}]^2[H^+]^3} \quad (4.8)$$

Estas relações sugerem que qualquer variação na razão Ir_3^+/Ir_4^+ deverá apresentar um efeito previsível na resposta ao pH. Tem sido esta variação nesta proporção a razão invocada por exemplo para as diferenças observadas entre elétrodos preparados por diferentes métodos mas também as alterações observadas com o envelhecimento dos mesmos. Por exemplo elétrodos acabados de preparar podem apresentar variações a rondar os 100 mV e quando exposto deliberadamente a agentes redox tais como $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ demonstram uma perda total de sensibilidade ao pH [50].

Entre as diferentes formas reduzidas e oxidadas dos óxidos e hidróxidos, muitas reações são possíveis. A composição estequiométrica exata é difícil de determinar, em especial para filmes hidratados depositados por via eletroquímica. Por esta razão os filmes depositados por via eletroquímica cujos resultados se apresentam neste capítulo serão denominados por IrO_x , de forma a englobar a incerteza na sua composição exata.

4.4.1.1. Crescimento de filmes de IrO_x em elétrodos de Ouro

Os filmes de IrO_x foram depositados por via eletroquímica, recorrendo a diferentes métodos eletroquímicos: voltametria cíclica e método galvanostático.

Como substrato inicial selecionou-se um eletrodo de ouro policristalino, uma vez que esta superfície, após limpeza mecânica e eletroquímica é bastante reprodutível e reutilizável para a deposição de diferentes ensaios.

As propriedades dos sensores de pH produzidos, baseados em óxido de irídio, foram examinadas em função do método de deposição eletroquímico selecionado.

Na figura seguinte ilustra-se o crescimento de um filme de IrO_x realizado por varrimentos sucessivos de potencial. Os resultados demonstram o aparecimento de picos anódicos e catódicos correspondentes à resposta eletroquímica do filme depositado. O aumento progressivo da intensidade destes picos com o varrimento sucessivo demonstra o crescimento progressivo do filme à superfície do eletrodo de ouro.

O voltamograma é caracterizado pelos picos anódicos e catódicos resultantes das cargas inerentes ao processo de oxidação e redução do óxido de irídio depositado. Segundo reportado [51], o irídio apresenta diferentes estados de oxidação ao longo da eletrodeposição. $Ir(III)$ para potencial menor que -0.15V, $Ir(IV)$ para $-0.15V < E < 0.2V$ e $Ir(V)$ para $E > 0.2V$.

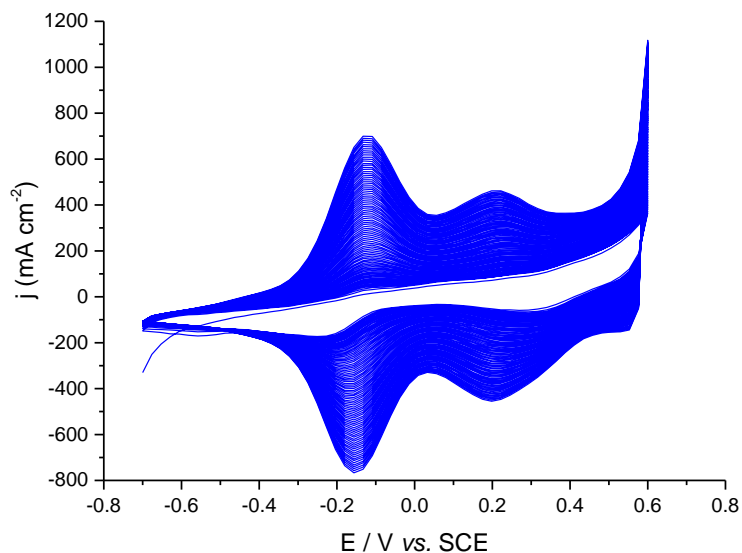


Figura 4.8 – Crescimento potenciodinâmico de um filme de IrO_x em ouro. 90 ciclos consecutivos a 50 mV/s entre -0.7 a 0.7 V vs. ESC.

A resposta eletroquímica do filme depositado anteriormente, em tampão fosfato salino pH 7 encontra-se apresentada na Figura 4.9. O voltamograma cíclico apresentado contém o pico de oxidação esperado para o par $\text{Ir}_3^+/\text{Ir}_4^+$ a ~ 165 mV e o correspondente pico de redução localizado a cerca de 100 mV. O varrimento de potencial ao longo do pico de oxidação faz com que se observe a alteração de coloração de incolor (Ir_2O_3) para azul brilhante (IrO_x). Este comportamento voltamétrico observado é idêntico ao descrito na literatura para o IrO_x em numerosos estudos [38].

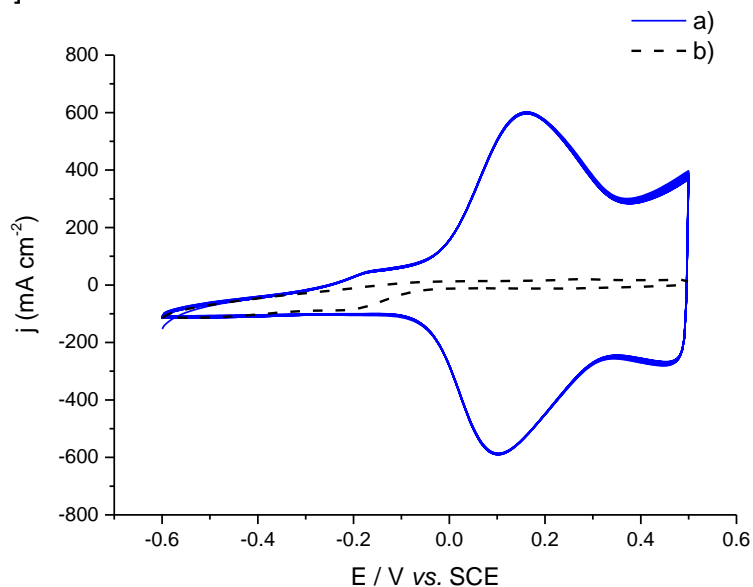


Figura 4.9 – Resposta eletroquímica em tampão fosfato pH 7 de a) filme de IrO_x depositado de acordo com a figura anterior. 20 Ciclos a $v = 50$ mV/s e b) eletrodo de ouro limpo nas mesmas condições.

A constância nas correntes registadas com o varrimento sucessivo de potencial revela também uma elevada estabilidade eletroquímica dos filmes obtidos.

Um olhar mais detalhado sobre o voltamograma permite detetar o aparecimento de um pré pico anódico, a cerca de -180 mV. O aparecimento deste pré pico tem sido também reportado na literatura e atribuído geralmente a um processo de envelhecimento do filme, resultado do tempo a que está submetido a potenciais redutores [52].

Por forma a avaliar o desempenho na medida de pH dos elétrodos obtidos baseados em óxidos de irídio, realizou-se inicialmente o mesmo estudo recorrendo a um eletrodo de pH de vidro comercial.

Este ensaio foi realizado com o intuito de verificar o comportamento de um eletrodo de pH comercial de vidro de modo a tentar aferir as diferenças com os elétrodos de óxido de irídio construídos ao longo do projeto. Dentro de um goblet foram introduzidos 25 mL de solução tampão universal pH 2 (descrito secção 4.3.2.), com agitação magnética de 600 rpm foram adicionados 100 μ L de solução de NaOH 0.1M de modo a obter diferenças visíveis no pH da solução, após a solução atingir valores acima do pH 10 o mesmo foi efetuado utilizando uma solução de HCl 0.1M. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.4 e representados graficamente na Figura 4.10.

Tabela 4.4 – Valores obtidos de força eletromotriz (EMF) para cada adição de ácido e base e respetivo pH.

Solução	Volume	pH	mV		Volume	pH	mV
Início	0	2.02	285				
NaOH	100	2.14	278	HCl	100	9.47	-149
	200	2.29	270		200	8.75	-107
	300	2.51	257		300	7.95	-57
	400	2.86	236		400	6.71	12
	500	3.59	194		500	5.08	107
	600	5.12	105		600	3.35	208
	700	6.49	25		700	2.69	246
	800	7.54	-36		800	2.39	264
	900	8.38	-87		900	2.18	218
	1000	9.00	-122		1000	2.04	284
	1100	9.57	-155				
	1200	10.64	-218				

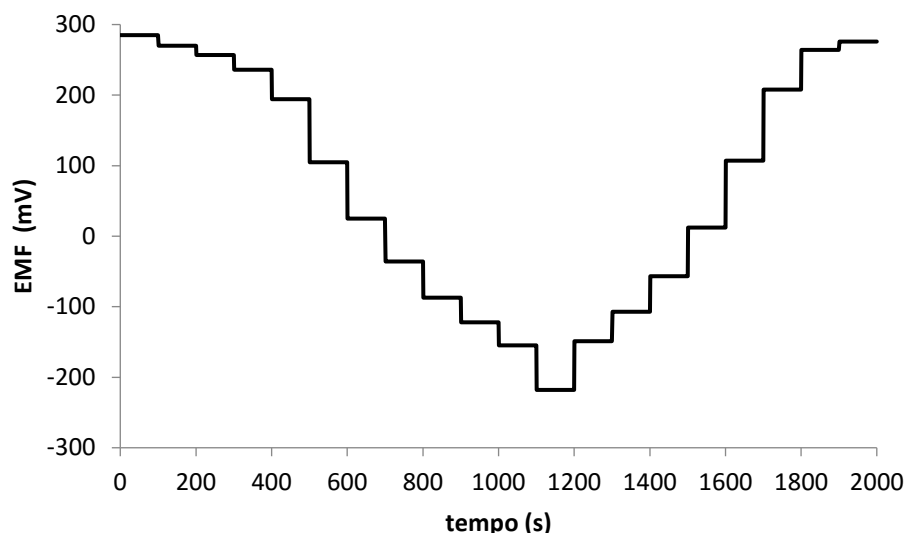


Figura 4.10 – Representação gráfica da variação de EMF em função da adição de base e ácido a uma solução tampão com pH inicial 2.02.

A partir da resposta apresentada pelo eletrodo de vidro comercial na Figura 4.10 foi realizada a representação gráfica da força eletromotriz² em função do pH, Figura 4.11, onde se verifica que existe linearidade tanto na resposta com adição de base para subir pH, como na resposta para a adição de ácido. Ambas as retas apresentam um valor de resposta do eletrodo muito próximo do ideal, 59 mV por unidade de pH.

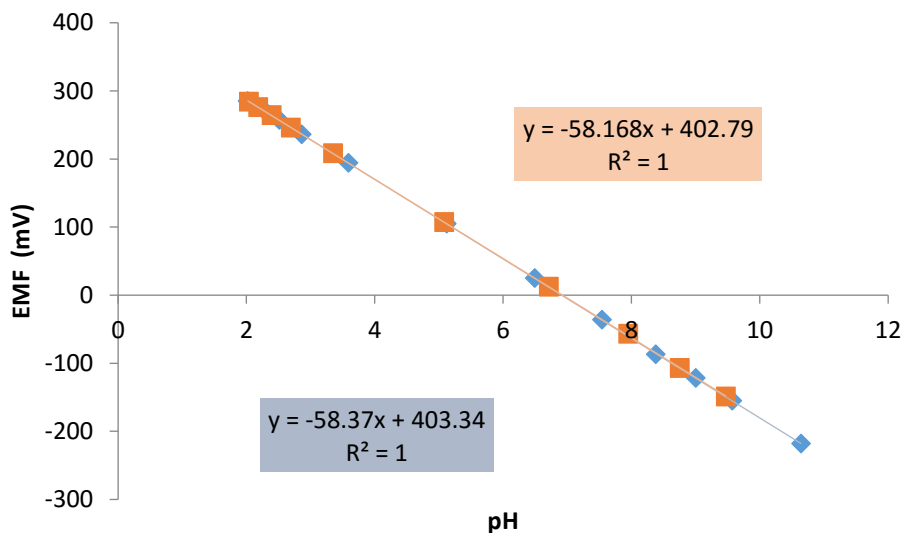


Figura 4.11 – Representação gráfica da EMF em função do pH, para o processo de adição de base (azul) e de adição de ácido (cor laranja).

² A força eletromotriz (EMF) é obtida pela diferença de potencial do eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo saturado de calomelanos (SCE).

Após obtenção da resposta do eletrodo comercial de vidro à mudança de pH da solução, efetuou-se o mesmo estudo para o eletrodo modificado com filme de IrO_x , formado potenciodinamicamente, com o crescimento ilustrado na Figura 4.8. A sua resposta a soluções de tampão universal com diferentes valores de pH foi avaliada, sendo apresentado na Figura 4.12 o transiente de potencial da resposta do eletrodo em cada solução bem como a representação da linearidade da força eletromotriz em função do pH.

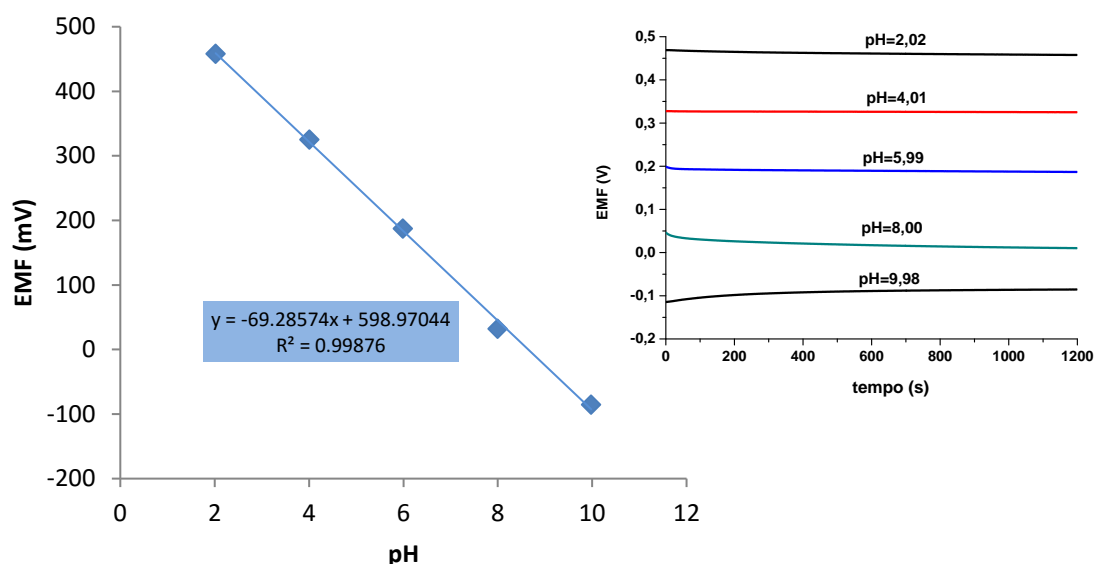


Figura 4.12 – Representação gráfica da linearidade existente entre a EMF e o pH, e os respectivos transientes de potencial com o tempo para cada pH, para o filme de IrO_x crescido pelo método potenciodinâmico.

A resposta apresentada pelo eletrodo à variação do pH demonstra ser linear, permitindo a calibração do mesmo recorrendo a dois pontos da curva, e apresenta uma resposta quase nernstiana (69 mV por unidade pH), isto é, próximo do valor ideal segundo a equação de Nerst, 59 mV por unidade de pH.

De forma análoga ao efetuado para o eletrodo comercial foi realizado o estudo da resposta do eletrodo de óxido de irídio à adição de alíquotas de NaOH 1M a cada 60 segundos e posterior adição de HCl 1M a cada 60 segundos, o resultado é apresentado na Figura 4.13.

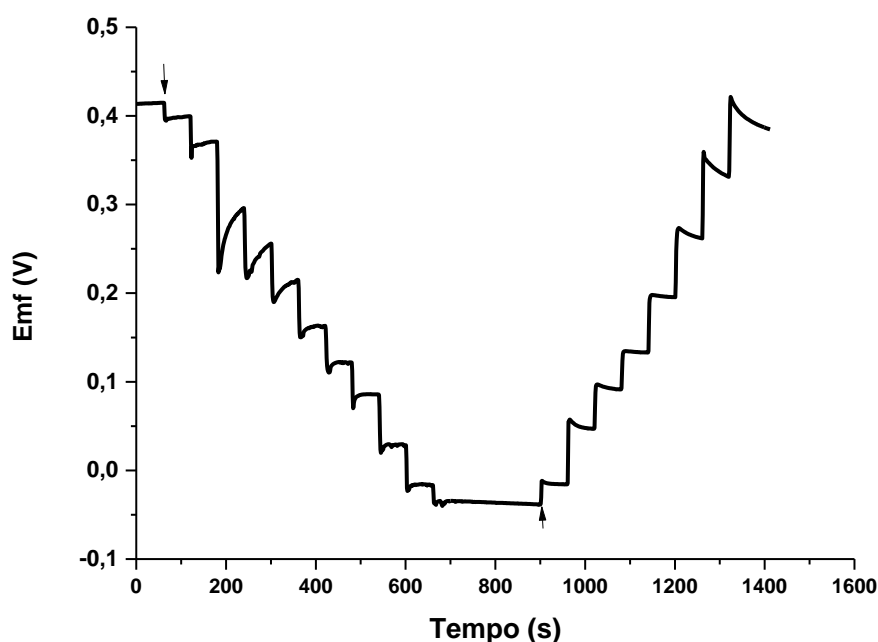


Figura 4.13 – Representação gráfica da variação de EMF em função da adição de base e ácido a uma solução tampão com pH inicial 2.02 para um eletrodo modificado com filme de IrO_x de modo potenciodinâmico.

Pela observação da Figura 4.13 verifica-se que os patamares de pH não são definidos e estáveis como o apresentado na Figura 4.10 para o eletrodo comercial de vidro. O tempo de resposta do eletrodo é lento para o efeito pretendido, deste modo e uma vez que a técnica de crescimento de filmes potenciodinâmico implica bastante tempo de formação do óxido de irídio (aproximadamente 40 minutos) decidiu-se testar o crescimento do filme pelo método galvanostático.

Na Figura 4.14 apresenta-se o crescimento de um filme de IrO_x recorrendo ao método galvanostático (1 mA/cm²).

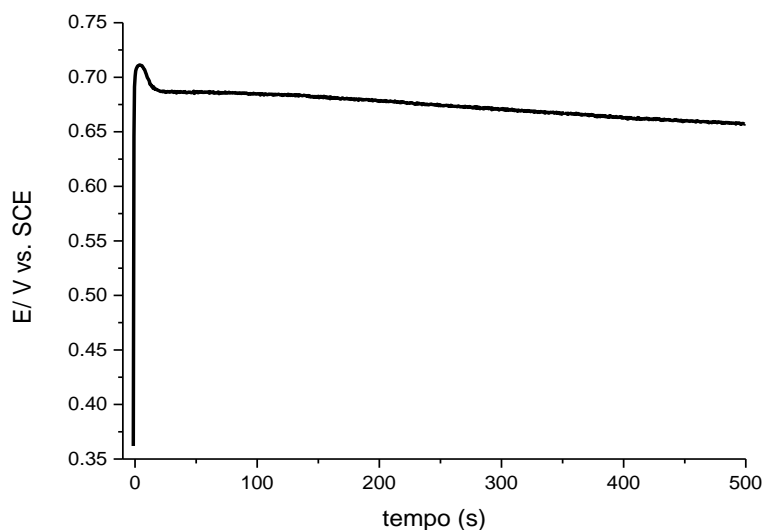


Figura 4.14 – Curvas cronopotenciométricas correspondentes ao crescimento galvanostático de IrO_x em Au a 1 mA cm⁻² (Q= 500 mC cm⁻²).

Os cronopotenciogramas obtidos são idênticos, por exemplo, aos reportados na literatura para a deposição de polímeros condutores em metais nobres a partir de soluções aquosas [53]. Os perfis registados, potencial vs. tempo, podem ser descritos considerando três regimes distintos. O primeiro caracteriza-se por um aumento rápido de potencial resultado do processo difusional de oxidação do ião em solução. A queda de potencial que caracteriza o segundo regime, decorre do crescimento de núcleos e formação de nova fase à superfície do eléctrodo. À medida que o processo de electrodeposição prossegue o sinal registado atinge um patamar correspondente ao crescimento e consequente aumento de espessura do depósito.

A resposta do eléctrodo a variações de pH é ilustrada na seguinte figura, em que se mostra a linearidade através de uma representação gráfica da força eletromotriz em função do pH bem como o transiente de potencial do eléctrodo para cada pH com o tempo.

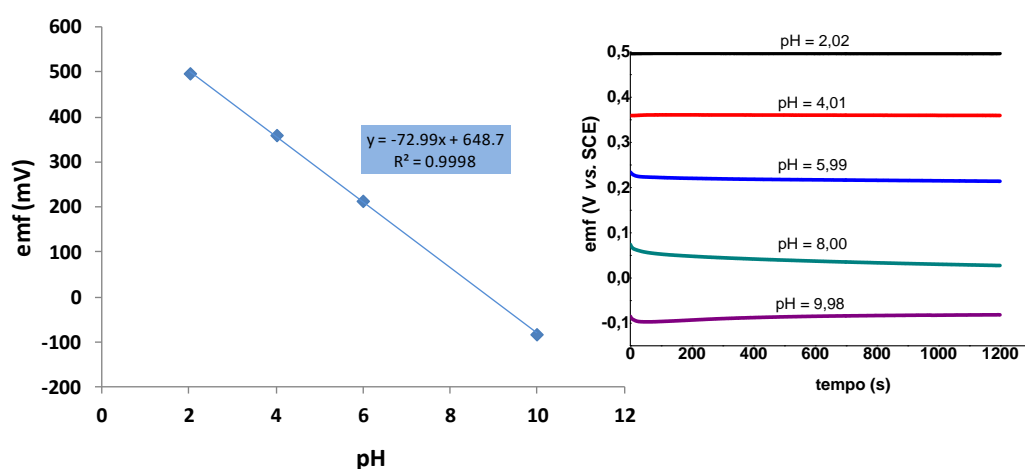


Figura 4.15 – Representação gráfica da linearidade existente entre a EMF e o pH, e os respectivos transientes de potencial com o tempo para cada pH, para o filme de IrOx crescido pelo método galvanostático (1 mA/cm²).

Pela observação da Figura 4.15 verifica-se que para valores mais elevados de pH a resposta demora bastante tempo a estabilizar, sendo necessário otimizar condições de modo a reduzir o tempo necessário para a estabilização do sinal.

Foram realizados três ensaios de electrodeposição através do método galvanostático, fazendo variar a densidade de corrente entre 1 e 0.1 mA/cm².

Uma vez que se manteve o mesmo tempo de electrodeposição significa que não só os filmes foram depositados a diferentes densidades de corrente mas consequentemente com diferentes cargas de electrodeposição envolvidas. Este facto encontra-se evidente nos voltamogramas obtidos, Figura 4.16, obtendo-se significativas diferenças nas cargas associados ao processo redox.

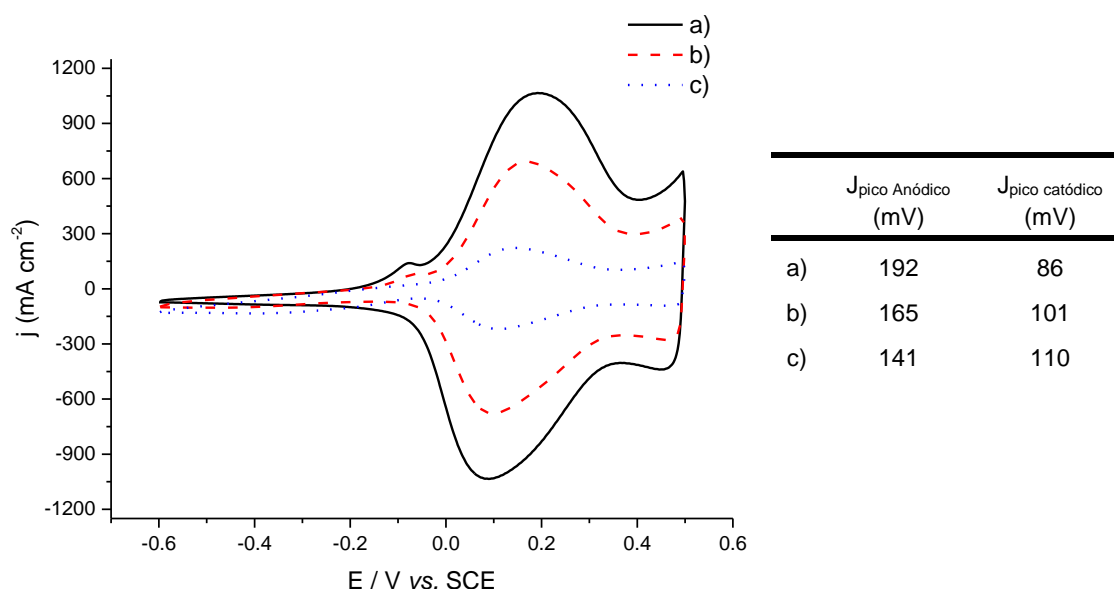


Figura 4.16 – Resposta eletroquímica em tampão fosfato salino pH 7 de filmes de IrO_x crescidos galvanostaticamente com: a) 1 mA cm^{-2} , b) 0.5 mA cm^{-2} e c) 0.1 mA cm^{-2} ($v = 50 \text{ mV/s}$) e respetiva tabela com valores de potencial correspondentes à oxidação (pico anódico) e à redução (pico catódico) do filme de IrO_x .

Os resultados revelam que todos os crescimentos apresentam resposta proveniente dos óxidos de irídio, apresentando um par redox reversível. Quanto maior a densidade de corrente de crescimento do filme, maior o espaçamento entre o pico de oxidação e redução proveniente do aumento da espessura do filme à superfície de eletrodo e consequente diminuição na velocidade de transferência de carga. Perante os resultados optou-se por utilizar o filme crescido com densidade de corrente de 0.1 mA/cm^2 para verificar a resposta à variação de pH, os resultados são apresentados na Figura 4.17 e foram realizados de forma análoga ao efetuado para o filme crescido utilizando a técnica de voltametria cíclica.

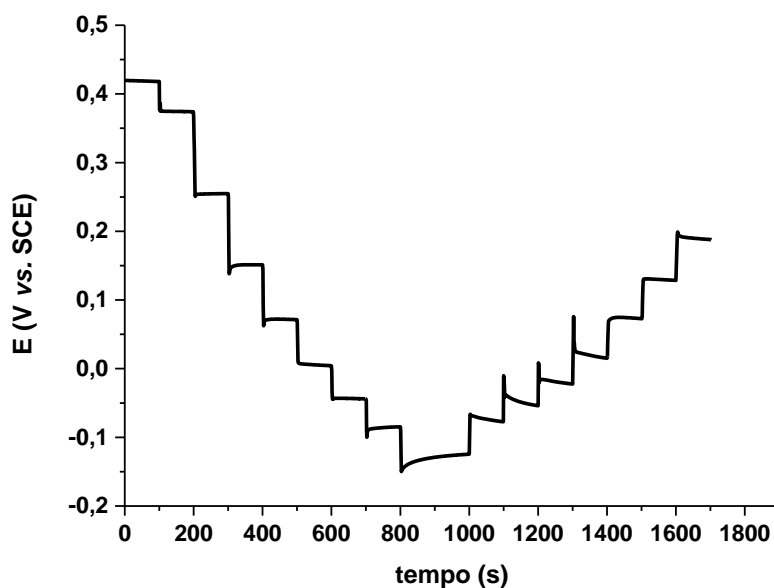


Figura 4.17 – Representação gráfica da variação de EMF em função da adição de base e ácido a uma solução tampão com pH inicial 2.02 para um eletrodo modificado com filme de IrO_x de modo galvanostático com 0.1 mA/cm^2 .

Pela observação da figura é possível verificar que o tempo de resposta entre as várias adições de base ou ácido é inferior ao obtido para o filme crescido de modo potenciodinâmico, mostrando melhor estabilidade.

As principais conclusões retiradas deste primeiro estudo foram:

- Os filmes de IrOx formados por via eletroquímica não são estáveis a pH iguais ou superiores a 10, podendo ter desvios superiores a 50 mV. No entanto de um ponto de vista de aplicação no corrente projeto, esta desvantagem tem pouco significado uma vez que o intervalo de pH do vinho varia apenas entre 2 e 5.
- A deposição por imposição constante de corrente, galvanostático, é mais eficiente uma vez que para a mesma carga de deposição os filmes depositados por este método revelam maior eletroactividade quando caracterizados por via eletroquímica.

4.4.1.2. Otimização das condições eletroquímicas de crescimento de IrOx

Baseados nos resultados anteriores, nomeadamente na maior eficiência do método galvanotático e no menor tempo para obtenção dos filmes, decidiu-se otimizar o crescimento dos filmes de IrOx pelo método galvanostático de acordo com os parâmetros da tabela seguinte.

Tabela 4.5 – Condições experimentais ensaiadas no estudo sistemático da eletrodeposição de filmes de IrOx em ouro.

<i>Método eletroquímico</i>	<i>Constante</i>	<i>Variável</i>
Galvanostático	0.1 mAcm ⁻²	10; 50; 100 e 200 mCcm ⁻²

A escolha das melhores condições de crescimento será efetuada mediante vários fatores:

- Estabilidade do processo redox avaliada por voltametria cíclica recorrendo a vários ciclos de varrimento de potencial em tampão, e determinando a carga envolvida no processo de oxidação/redução para cada ciclo.
- Na adesão do filme à superfície de elétrodo medida pela mudança da carga eletroactiva no elétrodo após exposição a ultrassons durante 5 minutos.
- Tempo necessário para obter estabilidade na resposta do elétrodo quando o pH é alterado de forma brusca, é considerado estável quando a variação de potencial em função do tempo é inferior a 0.2 mV/minuto, a aquisição é efetuada ao longo de 500 segundos.
- Curva de calibração.

O estudo da estabilidade do filme crescido na superfície de eletrodo foi efetuado em tampão universal pH 5.8. Na figura seguinte é apresentado, a título ilustrativo, o voltamograma cíclico para o filme crescido com densidade de corrente de 0.1 mA/cm² e carga de deposição de 100 mC/cm².

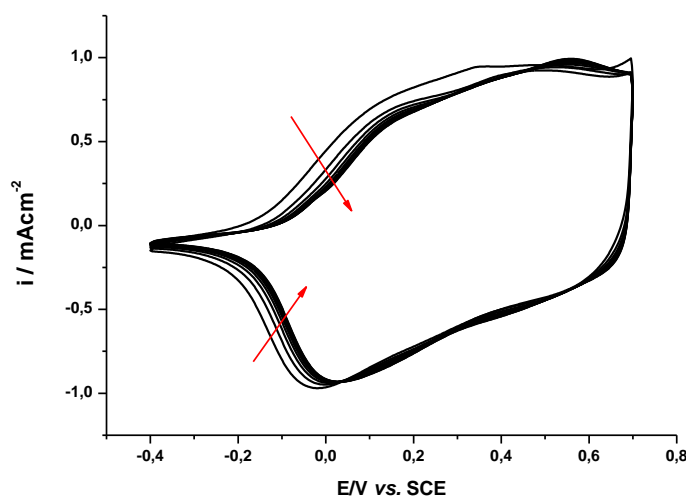


Figura 4.18 – Resposta eletroquímica do filme crescido pelo método galvanostático com densidade de corrente 0.1 mA/cm² e carga 100 mC/cm² quando submetido a varrimentos de potencial sucessivos entre -0.4 e 0.65V, $v = 50$ mV/s, em tampão universal com pH 5.8.

Verifica-se que existe um decréscimo nas correntes com o aumento do número de ciclos, com tendência para estabilizar. A carga inerente ao processo de redução é calculada à semelhança do procedimento reportado por Ross D. Meyer 2001 [54].

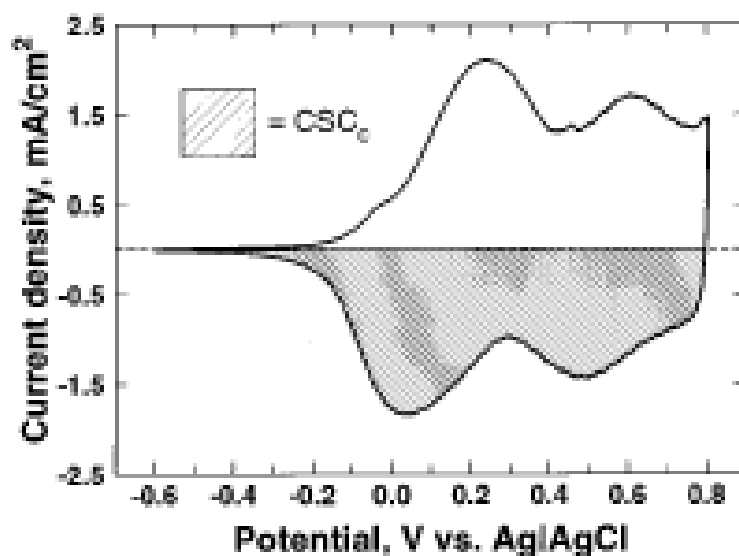


Figura 4.19 – Ilustração retirada da publicação de Ross D. Meyer [54], de modo a ilustrar o cálculo da carga inerente ao processo de redução do filme.

Assumindo que todos os átomos de irídio são ativos electroquimicamente, a quantidade de óxido de irídio no eléctrodo é estimada pela integração da densidade de corrente em função do potencial ao longo do processo de catódico, ilustrado na Figura 4.19 a cinzento com legenda de CSC (*cathodic charge storage capacity*).

De modo a perceber um pouco mais sobre a oxidação/redução do filme de óxido de irídio à superfície de eléctrodo, realizou-se o estudo da estabilidade do mesmo filme em solução 0.1M de H_2SO_4 apresentado na figura seguinte.

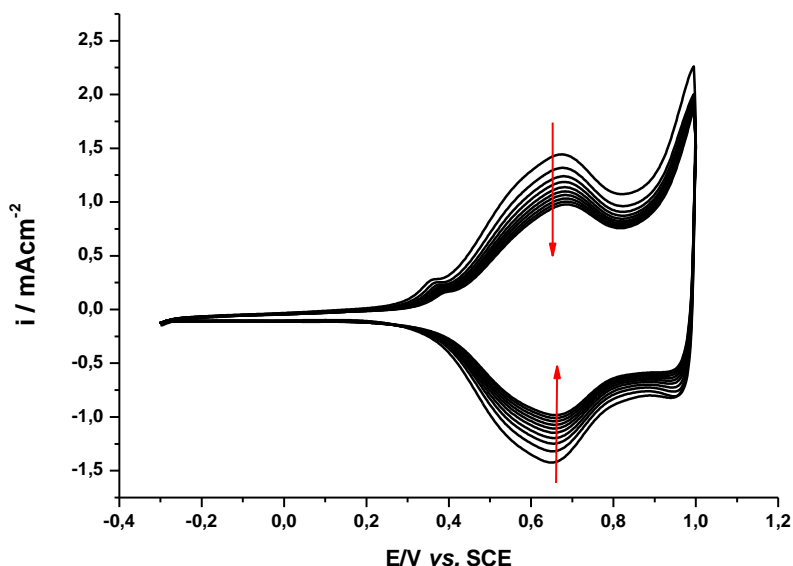


Figura 4.20 – Resposta do filme de IrO_x em H_2SO_4 0.1M quando submetido a varrimento de potencial entre -0.3 e 1 V vs SCE, $v = 50$ mV/s.

Pela observação da Figura 4.20 verifica-se que existe perda de carga do sistema redox com o número de ciclos, este decréscimo de carga pode ser explicado pela corrosão de material em pH muito baixo. Com o objetivo definido para a utilização do eléctrodo em solução de vinho, os resultados apresentados na Figura 4.20 não são comprometedores uma vez que o pH do vinho varia entre 2 e 5.

Foram efetuados os crescimentos galvanostáticos com densidade de corrente constante de 0.1 mA/cm^2 fazendo variar a carga de cada crescimento de cada filme e por conseguinte a espessura do mesmo. Uma estimativa da espessura dos filmes de IrO_x depositados pode ser obtida a partir da seguinte relação [39]:

$$h = \frac{QM_w}{ndFA} \quad (4.9)$$

Q – Carga envolvida no processo redox

M_w – Peso Molecular do óxido de irídio;

n – número de eletrões; 2

d – densidade do óxido de irídio; 11.69 g cm^{-3}

F- constante de faraday; $96485.3415 \text{ Cmol}^{-1}$

A- área do eléctrodo; 0.0314 cm^2

Não foram calculadas as espessuras dos diferentes filmes devido à incerteza associada à estrutura química do óxido de irídio formado, contudo esta expressão

permite-nos afirmar que um aumento na carga corresponde a um aumento na espessura.

Na figura seguinte apresentam-se as respostas eletroquímicas registadas em tampão universal pH 5.6 para filmes de IrO_x crescidos pelo método galvanostático com diferentes cargas de crescimento.

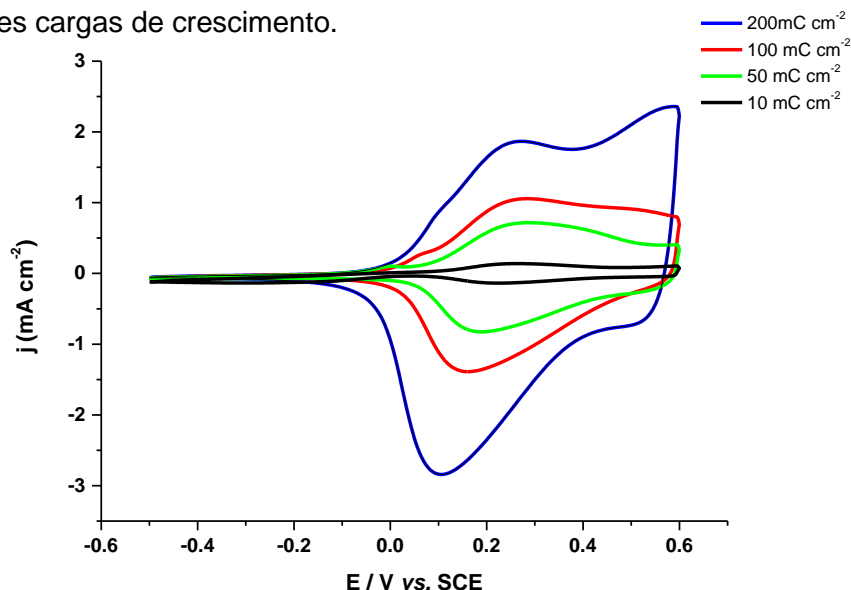


Figura 4.21 – Resposta eletroquímica em tampão universal pH 5.6 dos filmes crescidos galvanostaticamente com $i = 0.1 \text{ mA/cm}^2$ e diferentes cargas de crescimento quando submetidos a varrimento de potencial entre -0.5 e 0.6 V vs SCE, $v = 50 \text{ mV/s}$.

A Figura 4.21 permite verificar que quanto maior a espessura do filme, maior a quantidade de matéria eletroactiva e por conseguinte maior sinal de resposta no varrimento de potencial anódico e catódico aumentando também o tempo necessário para a transferência de carga como se pode verificar pelo afastamentos entre os picos do par redox. A resposta de cada filme quando sujeita a uma mudança brusca no pH é apresentada na Figura 4.22 para cada condição de crescimento.

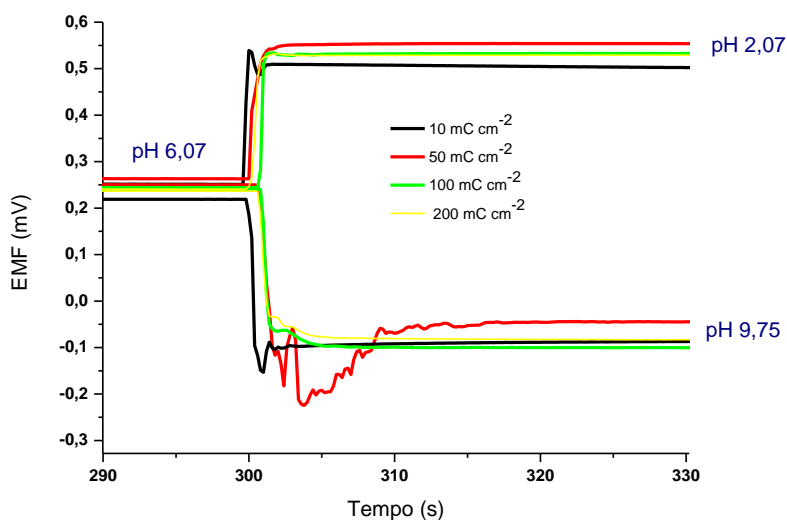


Figura 4.22 – Registo da variação de potencial dos diferentes filmes quando expostos a variações bruscas de pH, tanto para valores inferiores ao valor base, 6.07, como para valores superiores.

Pela observação da Figura 4.22 verifica-se que a resposta para valores de pH mais elevados é mais instável do que a resposta para valores de pH baixos. Nos estudos seguintes somente se estudará a estabilidade para valores de pH mais baixos, contudo dentro da gama de interesse para a finalidade do eletrodo.

Após o estudo de estabilidade da resposta eletroquímica para a deposição de IrO_x a otimização das condições de crescimento foi efetuada considerando os seguintes parâmetros obtidos durante a caracterização dos filmes como sensores de pH:

- Linearidade da curva de calibração obtida e declive observado
- Aderência dos filmes ao substrato. Medida através do cálculo da resposta eletroquímica antes e após sonicação durante 5 minutos.
- Tempo requerido para obter uma variação de $\Delta E/\Delta t = 0.2 \text{ mV/min}$ quando se realiza um salto de pH de 7.27 para 1.90 com registo do transiente de potencial durante 500 s.

Na tabela seguinte encontram-se compilados os resultados obtidos considerando os parâmetros previamente selecionados. Na primeira parte da tabela compara-se a estabilidade dos filmes obtidos através da perda de eletroatividade registada entre a carga obtida no primeiro ciclo de caracterização versus a determinada após 10 ciclos consecutivos. Verifica-se que ocorre uma perda de sinal entre 5 e 11 %, tendo o melhor resultado sido obtido para filmes com cargas de crescimento de 50 mC/cm^2 . No entanto, os resultados obtidos após sonicação, segunda parte da tabela, são inequívocos na seleção dos filmes crescidos com 100 mC/cm^2 . Não só os resultados indicam que são estes os revestimentos mais aderentes, apenas uma perda de sinal de 2,64 % após submissão ao processo agressivo de sonicação, como são aqueles em que a resposta do sensor é mais rápida atingindo um drift de 0.5 mV/min após 5 s e de 0.2 mV/min após 65 s.

Tabela 4.6 – Resultados obtidos considerando os parâmetros descritos anteriormente para a seleção das condições de deposição dos filmes de IrO_x em ouro.

Método	Variável (mC/cm^2)	Carga 1º ciclo (mC)	Carga do 10º ciclo (mC)	Perda de Sinal (%)	Carga após sonicação 5 min (mC)	Perda de Carga (%)	$t(\Delta E/\Delta t)$ (0,5 mV/min)	$t(\Delta E/\Delta t)$ (0,2 mV/min)
Galvanostático (0,1 mA cm^{-2})	200 mCcm^{-2}	0,6155	0,5553	9,78%	0,2543	54,2%	126 s	248 s
	100 mCcm^{-2}	0,6340	0,5800	8,51%	0,5647	2,64%	< 5s	65 s
	50 mCcm^{-2}	0,3368	0,3184	5,46%	0,3051	4,17%	> 500 s	---
	10 mCcm^{-2}	0,1711	0,15189	11,22 %	0,1446	4,79%	> 500 s	---

A representação gráfica, relativa aos dados apresentados na tabela anterior, pode ser analisada nas figuras seguintes.

A Figura 4.23 ilustra o registo do sinal para os diferentes filmes quando submetidos a uma variação brusca no valor do pH da solução na qual estão imersos. Destes registos foram retirados os valores de drift de $\Delta E/\Delta t$ para 0.5 mV/min e 0.2 mV/min .

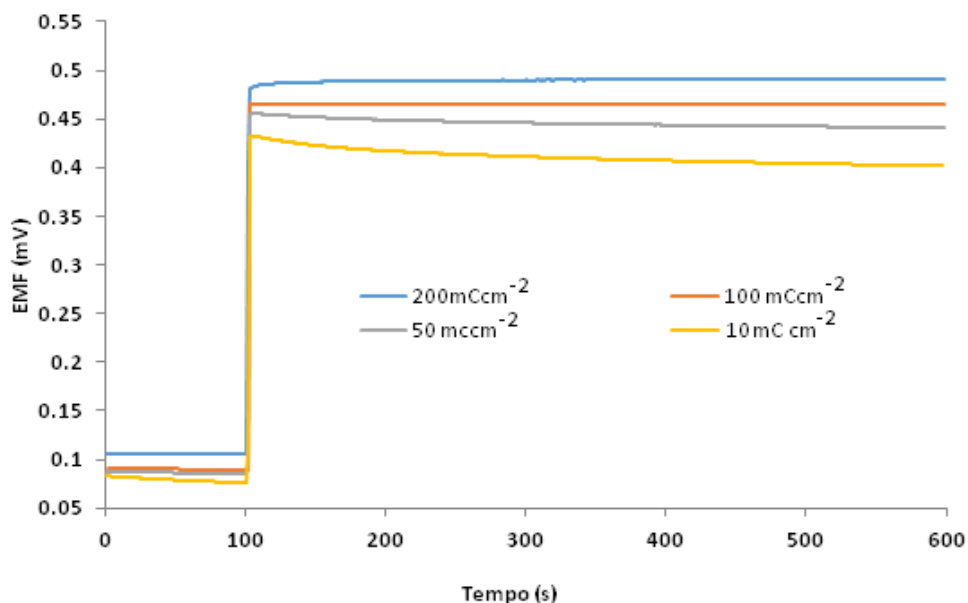


Figura 4.23 – Registo da variação de potencial observada para os filmes de IrO_x depositados com diferentes espessuras quando submetidos a uma alteração brusca do valor do pH da solução na qual estão imersos.

Na Figura 4.24 estão apresentados os resultados obtidos para os filmes crescidos nas condições otimizadas, método galvanostático a 0,1 mA cm⁻² com 100 mC cm⁻² de carga de deposição. Encontra-se apresentado a resposta do sensor, em mV, com o tempo de imersão em soluções com diferentes valores de pH.

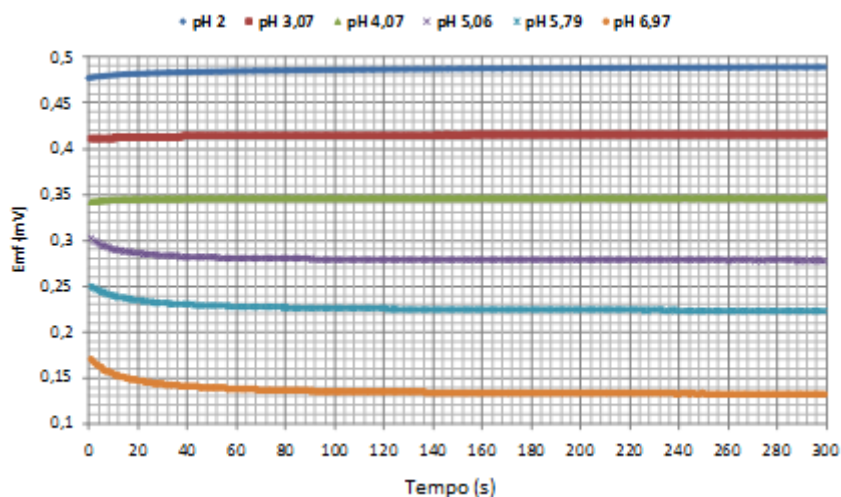


Figura 4.24 – Transientes da resposta do sensor de pH baseado num filme de IrO_x depositado em ouro pelo método galvanostático a 0,1 mA cm⁻² com 100 mC cm⁻² de carga de deposição.

Observando as curvas de calibração dos diferentes filmes de óxido de irídio testados, Figura 4.25, verifica-se que todos apresentam uma boa linearidade no intervalo de pH estudado (2 a 7) com coeficiente de correlação na ordem de 0,999. No

entanto como se pode observar os declives obtidos são bastante superiores aos teóricos esperados de -59.2 mV/pH indicando que os filmes obtidos por via eletroquímica têm uma resposta supra-ernstiana, eventualmente pela formação de óxidos mistos de IrO_x .

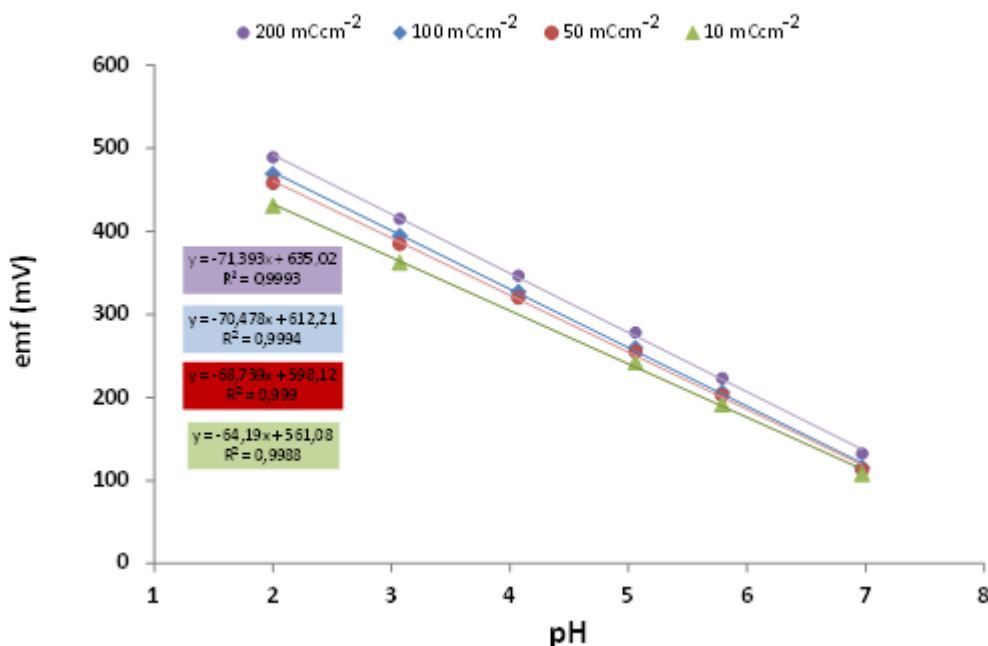


Figura 4.25 – Representação gráfica das curvas de calibração obtidas para os filmes de IrO_x depositados com diferentes cargas de crescimento.

Os resultados anteriores demonstram a obtenção de elétrodos de pH de estado sólido com boa resposta que através da deposição de um filme de IrO_x . As condições de deposição dos filmes foram otimizadas considerando os parâmetros experimentais e a resposta dos elétrodos como sensores de pH extensivamente caracterizada.

4.4.1.3. Aplicação de elétrodos de IrO_x para a determinação do pH do vinho

Após a obtenção dos sensores de pH baseados óxido de irídio, descritos anteriormente, funcionais e com boa resposta à alteração do pH da solução em tampão, testou-se a aplicação dos mesmos na medição do pH de amostras de vinho.

Na Figura 4.26 está registado o perfil de sinal obtido, com o elétrodo de IrO_x obtido de acordo com as condições previamente otimizadas, quando imerso numa solução padrão de vinho (Tritivin AA1).

De acordo com o certificado de análise da amostra o pH da solução é de 3,66. No entanto recorrendo a um elétrodo comercial de vidro o valor de pH medido foi de 3,58. A aplicação do sensor de pH desenvolvido baseado em óxido de irídio foi de 6,87.

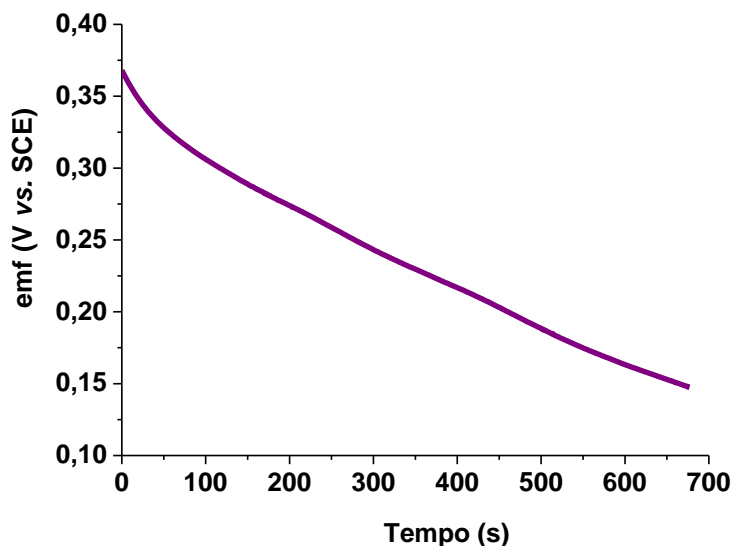


Figura 4.26 – Resposta do sinal de um eletrodo de IrO_x imerso numa solução de vinho padrão da Tritivin AA1.

Estes resultados indicam que o sensor de pH baseado em IrO_x não permite a medição do pH de amostras de vinho. De facto pela análise da figura verifica-se que nunca se atinge uma estabilização do sinal medido eventualmente devido à presença de espécies redox presentes nas amostras reais que interferem com o processo de medição. O mesmo ensaio foi realizado submetendo a amostra de vinho a uma coluna de extração, onde os compostos responsáveis pela coloração ficaram adsorvidos, e o resultado obtido foi idêntico.

Na tentativa de minimizar a interferência dos compostos presentes no vinho, uma fina camada de polifenol foi crescida à superfície do IrO_x. O crescimento foi efetuado realizando dois ciclos de varrimento de potencial entre 0,2 e 1,0 V versus SCE com velocidade de varrimento de 2 mV/s em tampão fosfato salino pH 7 com 10 mM de fenol. O crescimento é apresentado na Figura 4.27, bem como o transiente de potencial representativo da resposta na presença de soluções com diferentes pH's.

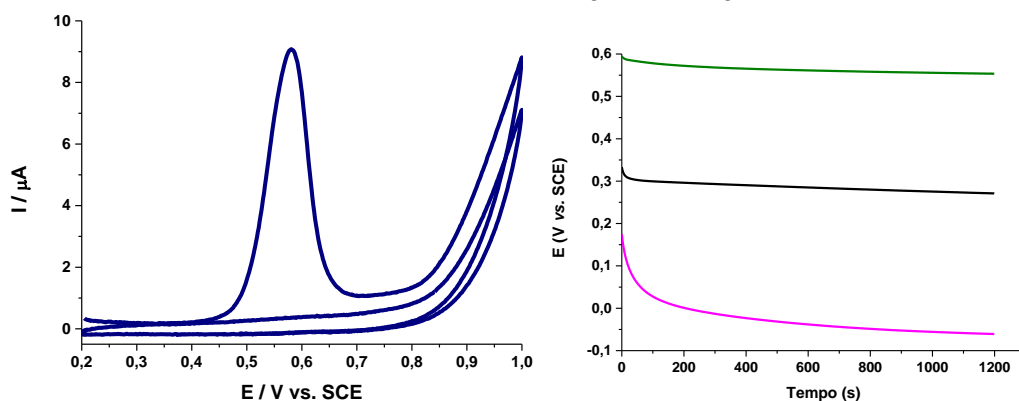


Figura 4.27 – Crescimento potenciodinâmico de filme de polifenol na superfície de IrO_x entre 0,2 e 1V vs SCE com velocidade de varrimento = 2 mV/s, transiente de potencial do eletrodo modificado com polifenol para três valores de pH distintos.

Pela observação do transiente de potencial representado na Figura 4.27, verifica-se que a resposta do eletrodo de pH passivado com a camada de polifenol é mais lenta, demora mais a estabilizar o potencial para um determinado pH, sendo mais lento para pH mais elevados.

Foi realizado uma curva de calibração em tampão e um ensaio com vinho AA1 da tritivan para verificar se os problemas obtidos anteriormente eram colmatados com recurso à passivação do eletrodo, Figura 4.28.

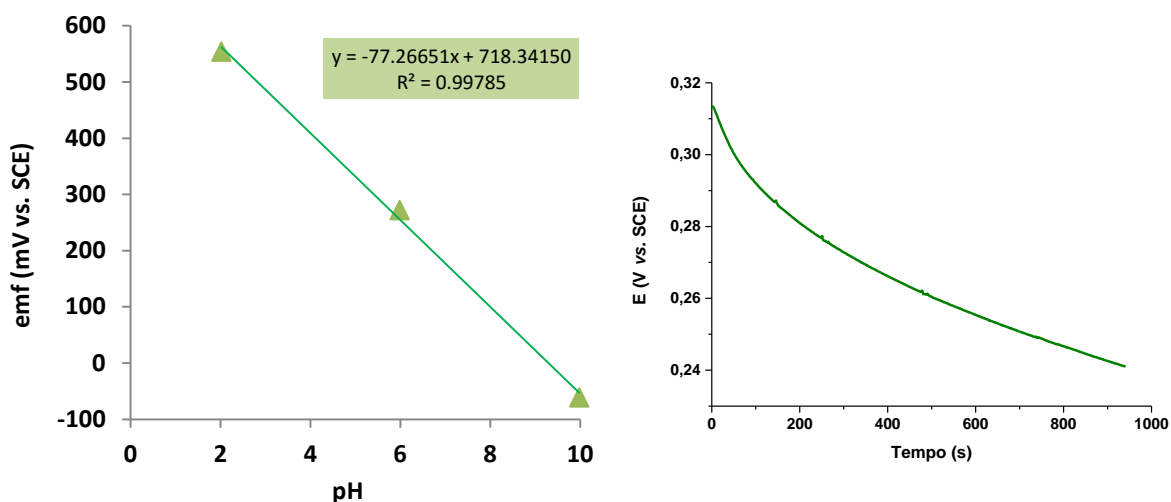


Figura 4.28 – Representação gráfica da curva de calibração obtidas para o filme de IrOx passivado com um filme de polifenol e respetiva resposta do sinal de eletrodo quando imerso numa solução de vinho padrão da Tritivin AA1.

O potencial de circuito aberto para o eletrodo imerso em vinho AA1, ao final de 1000 segundos não estabilizou, apresentando um valor de 240 mV o qual através da recta de calibração corresponde a um valor de $\text{pH} = 6.19$. A espera pela estabilização do sinal somente iria afastar ainda mais o valor de pH do rotulado no certificado de análise (3.66). Desta forma pode-se aferir que a passivação do eletrodo de óxido de irídio recorrendo à formação de uma camada de polifenol não resulta para eliminar interferentes presentes no vinho.

De forma a ultrapassar este constrangimento foram efetuados estudos de aplicação de membranas baseadas em Nafion à superfície dos eletrodos de forma a isolar a superfície de óxido de interferentes aniônicos presentes na amostra, permitindo no entanto a passagem de prótons necessário à medição do valor de pH. O esquema apresentado na figura seguinte ilustra o procedimento experimental a ser adotado para a imobilização da membrana de Nafion no eletrodo.

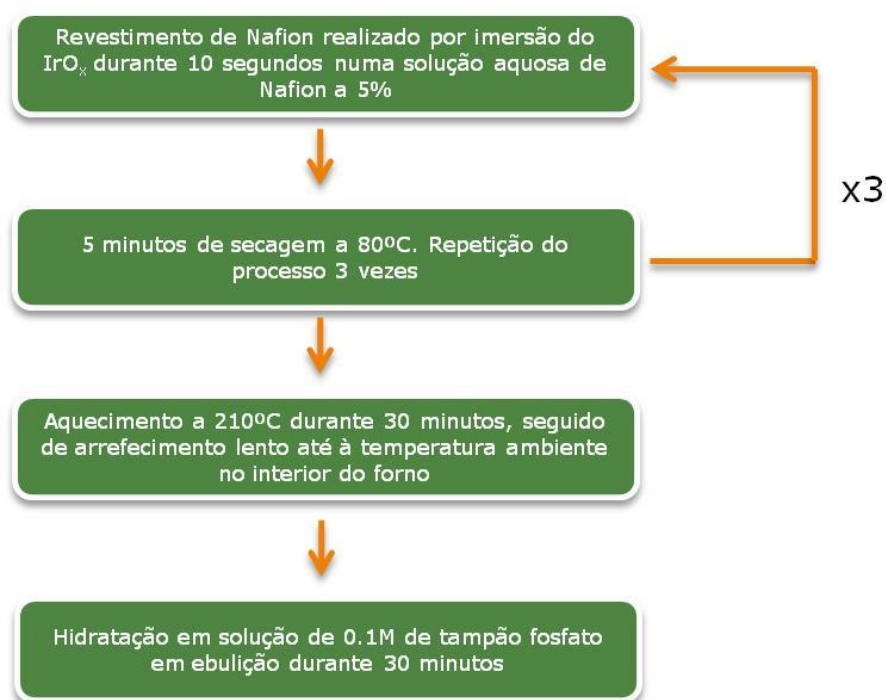


Figura 4.29 – Esquema ilustrativo do procedimento experimental a ser adotado para o revestimento dos eletrodos de pH com filmes de Nafion.

O passo de aquecimento do eletrodo modificado com nafion é bastante importante, pois aumenta a estabilidade física e a seletividade contra aniões. O aquecimento do Nafion perto da temperatura vítrea faz com que a estrutura micelar do nafion depositado a frio, inverta e passe os grupos sulfónicos das micelas do exterior para o interior das mesmas aumentando assim a densidade de carga com a diminuição dos orifícios internos. [55].

A adsorção da membrana de Nafion à superfície de eletrodo foi avaliada observando a resposta do eletrodo numa solução contendo o par redox ferro III/II, apresentado na Figura 4.30.

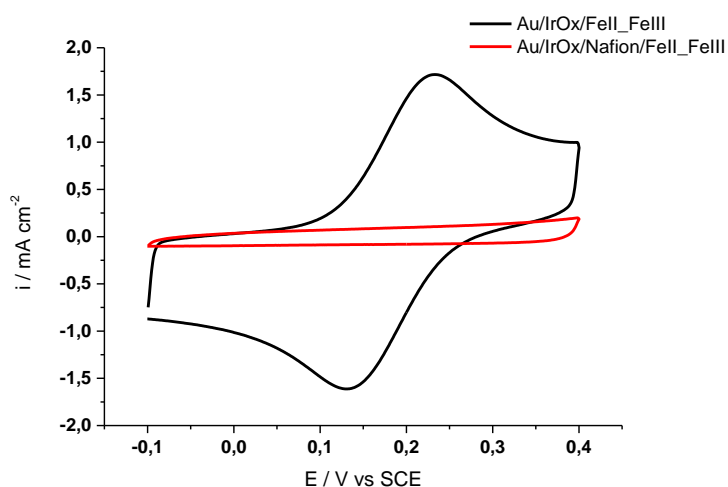


Figura 4.30 – Resposta de um eletrodo de Au/IrOx com e sem membrana de Nafion numa solução de 5mM de $\text{K}_3\text{Fe}_3(\text{CN})_6$, $v = 50\text{ mV/s}$.

Pela observação da Figura 4.30 verifica-se que a membrana de nafion está presente no eléctrodo, inibindo totalmente a oxidação e redução do ferro III/II na superfície de eléctrodo, tal como esperado, uma vez que a membrana permite somente a passagem de protões inibindo compostos aniónicos de se aproximarem à superfície de eléctrodo.

De modo a avaliar a resposta do eléctrodo modificado, realizou-se uma curva de calibração da resposta do mesmo em função do pH, Figura 4.31, verificando-se que o eléctrodo modificado apresenta um tempo elevado para estabilizar o sinal, optou-se por adquirir valores ao final de 500 segundos de modo a que o sinal estabilizasse.

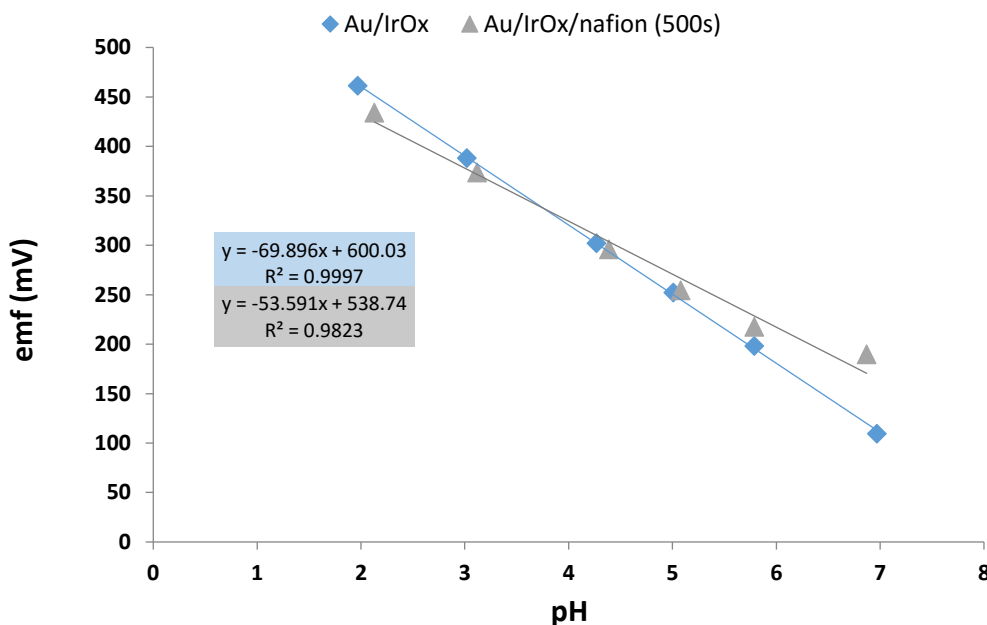


Figura 4.31 – Representação gráfica da curva de calibração obtidas para o filme de IrOx modificado com uma membrana de Nafion e na ausência da mesma para diferentes pH's.

A linearidade apresentada pelo eléctrodo modificado com Nafion decresceu em relação ao eléctrodo sem nafion, este facto pode ser devido à dificuldade de estabilização do sinal, possivelmente poderia ser colmatado com a aquisição de sinal a um tempo superior, contudo essa medida vai contra o pretendido, aumentando o tempo de resposta do eléctrodo.

Utilizou-se o vinho AA4 da tritivan para avaliar a resposta do eléctrodo na presença de vinho. O certificado do vinho AA4 enuncia pH de 2.83, o mesmo foi confirmado com recurso ao eléctrodo de pH de vidro apresentando valor idêntico ao mencionado no certificado, para o eléctrodo modificado com Nafion o resultado foi de 361.8 mV após 500 segundos de imersão do eléctrodo na solução, representando um valor de pH de 3.31, e tal como verificado anteriormente o sinal de potencial decresce com o aumento do tempo, sugerindo que ao aumentar o tempo de aquisição o sinal de pH se afasta ainda mais do sinal real.

Desta forma, excluiu-se o uso de Nafion para inibir os interferentes presentes no vinho com vista ao uso direto do eléctrodo de pH de estado solido.

Apesar dos avanços conseguidos no decurso deste trabalho é necessario mais optimização para a sua utilização na determinação do pH dos vinhos

4.4.1.4. Preparação de um eletrodo de ião seletivo de amónio de estado sólido

Nas últimas décadas a aplicação de sensores potenciométricos na monitorização de gases tem-se desenvolvido rapidamente, nomeadamente na deteção de oxigénio, dióxido de carbono, iões amónio entre outros [37] [56].

A construção do primeiro sensor potenciométrico, para a determinação de dióxido de carbono no sangue foi desenvolvida por Severinghaus e Bradley em 1958 [56]. Esta configuração apresenta no entanto, algumas limitações, nomeadamente:

- Resposta e tempos de recuperação lentos, principalmente a baixas concentrações de gases
- Baixa seletividade a outros gases que possam difundir pela membrana (e.g. CO₂)
- Limites de deteção elevados
- Dificuldades de miniaturização

De forma a ultrapassar estas limitações é possível a construção de ISE em estado sólido, no qual a medição do ião NH₄⁺ é medido diretamente em solução sem ser necessário qualquer tipo de pré-tratamento da solução de vinho com químicos cáusticos, onde a libertação de gases nocivos é evitada, tal como proposto na execução do corrente projeto.

A eliminação da solução interna de eletrólito de eletrodos seletivos de iões convencionais resulta em ISE eletrodos de estado sólido, os quais são mais duradouros, e mais fáceis de miniaturizar. No entanto para obter este tipo de eletrodos com um potencial de eletrodo estável, é necessário ter um sistema de transdução iónico-eletrónico suficientemente rápido e reversível em estado sólido sem a contribuição de reações paralelas parasitas. Este sistema de transdução é fornecido por uma camada intermédia que possua um sistema de condução misto iónico e eletrónico entre o elemento de referência e a membrana sensível ao ião a medir [57].

A solução de membrana é preparada conforme descrito na secção 4.3.3 e é adsorvida à superfície do eletrodo por deposição de 200 µL e secagem da mesma ao ar durante sensivelmente 1 hora.

Os primeiros resultados obtidos com este processo estão apresentados na figura seguinte, onde se verifica a linearidade da resposta do eletrodo em função da concentração de ião amónio, bem como a diferença na utilização de membrana no seu estado inicial ou utilizando o processo de hidratação descrito na secção 4.3.3

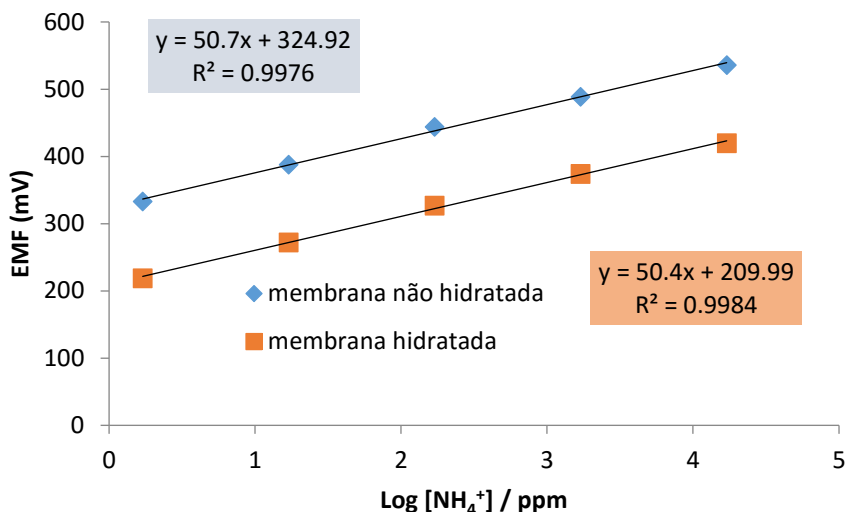


Figura 4.32 – Resposta de um sensor de íons amônio realizado através da deposição de uma membrana seletiva de íons amônio à superfície de um eletrodo de ouro. Comparação entre a resposta do sensor imediatamente após a sua construção (membrana não hidratada) versus a resposta obtida após hidratação da membrana por um período de 24 horas em 0.1M NH₄Cl.

Os resultados são bastante encorajadores verificando-se uma variação linear da resposta do sensor com o logaritmo da concentração de íon amônio presente em solução. Obtiveram-se declives na ordem dos 50 mV por Log[NH₄⁺], próximos dos esperados 59 mV para eletrodos bem comportados.

Foram testadas novas condições de imobilização da membrana à superfície de eletrodo, na Figura 4.32 são apresentados os resultados obtidos por imersão do eletrodo numa solução contendo a membrana em estado líquido, uma vez e cinco vezes, bem como um ensaio idêntico ao ensaio anterior em que são deixados 200 µL em cima do eletrodo (deposição) e espera-se que seque por uma hora; a repetição pretende avaliar se este método é reprodutível.

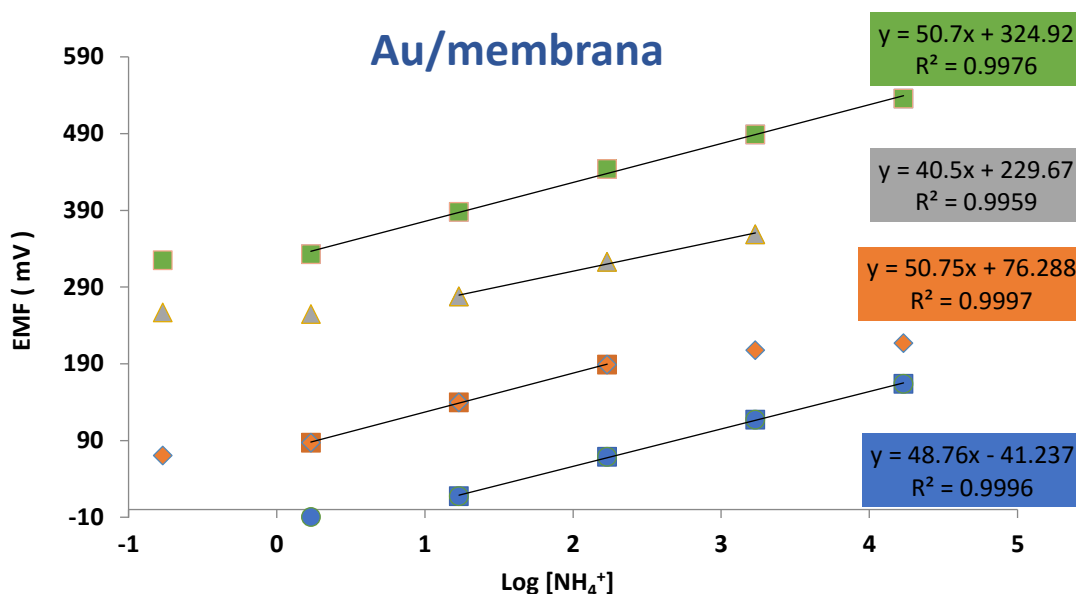


Figura 4.33 – Resposta de vários sensores de íons amônio realizados através de uma membrana seletiva de íons amônio à superfície de um eletrodo de ouro. Comparação entre deposição da membrana (verde e cor de laranja) ou formação da mesma por imersão de uma vez (cinza) e 5 vezes (azul)..

A Figura 4.33 permite verificar que o uso de duas técnicas distintas de preparação de membranas à superfície de eletrodo produz resultados bem distintos. No caso de imersão do eletrodo numa solução de membrana, observa-se que uma única imersão representa uma gama de linearidade baixa e a resposta do eletrodo encontra-se bastante longe do esperado, mas com o aumento para 5 imersões a gama de linearidade aumenta bem como o declive se aproxima do esperado, este resultado pode indicar ser necessário mais imersões para obter uma membrana estável. O resultado das membranas produzidas por deposição são distintos, apesar do procedimento ser idêntico para as duas.

Na tentativa de melhorar a reprodutibilidade e a própria estabilidade do sensor de íons amônio, optou-se por introduzir uma camada entre a membrana seletiva de íons amônio e o eletrodo de ouro de modo a obter um sistema misto iónico-eletrónico, para isso utilizou-se o eletrodo modificado com óxido de irídio proveniente do desenvolvimento de um eletrodo de pH e modificou-se um eletrodo com um filme de polipirrólo. Cada um destes eletrodos foi modificado com uma membrana seletiva de íons amônio, por deposição de 200 µL de solução de membrana em cima de cada um e deixando secar durante uma hora, a resposta dos mesmos em função do logaritmo da [NH₄⁺] é apresentada na Figura 4.34.

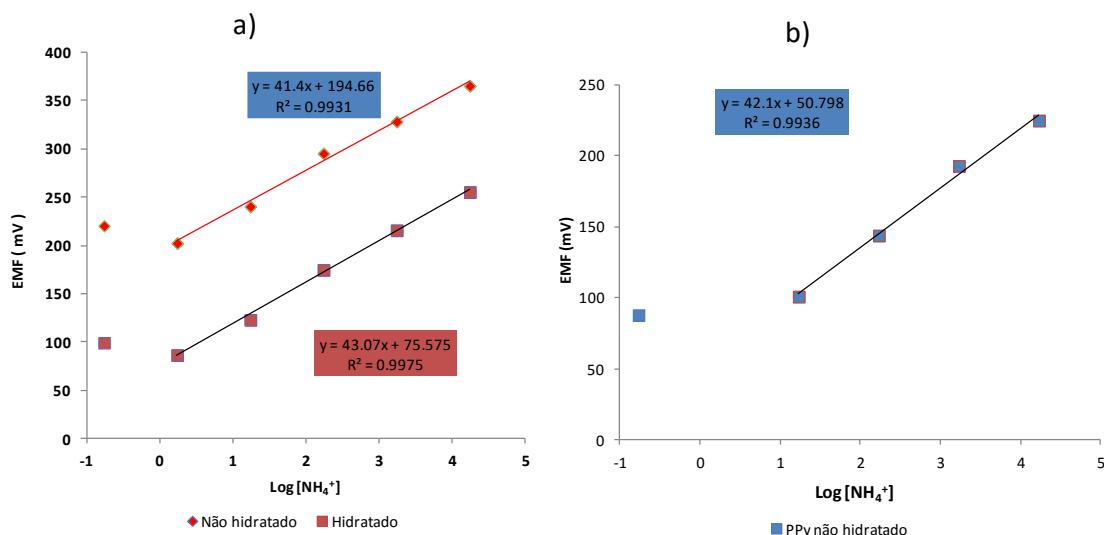


Figura 4.34 – Resposta de dois sensores de iões amónio realizados através da deposição de uma membrana seletiva de iões amónio à superfície de a) eléctrodo modificado com óxido de irídio hidratado e não hidratado e b) eléctrodo modificado com filme de polipirrol não hidratado.

Apesar dos diferentes eléctrodos apresentarem linearidade com o log da $[\text{NH}_4^+]$ a variação do sinal com a concentração está longe do valor esperado. Através destes resultados não se pode verificar qualquer vantagem em utilizar um condutor misto para favorecer a transferência eletrónica entre a membrana e o eléctrodo.

Por forma a avaliar de forma crítica a estabilidade dos diferentes eléctrodos de estado sólido formados, tem sido descrito na literatura [58] [59] que a aplicação de um pulso de corrente ao sistema corresponde a condições extremas, em comparação com medidas potenciométricas convencionais, e que informação mais fidedigna pode ser retirada do comportamento dos eléctrodos a esta perturbação. Exemplos do transiente de potencial-tempo registados após a aplicação de correntes de ± 1 nA a eléctrodos contendo uma interface de polipirrol e uma membrana hidratada e não hidratada estão representados figura seguinte.

Através destes ensaios de cronopotenciometria é possível visualizar imediatamente as diferenças na estabilidade dos eléctrodos sem se ter de se realizar estudos de estabilidade de longo termo.

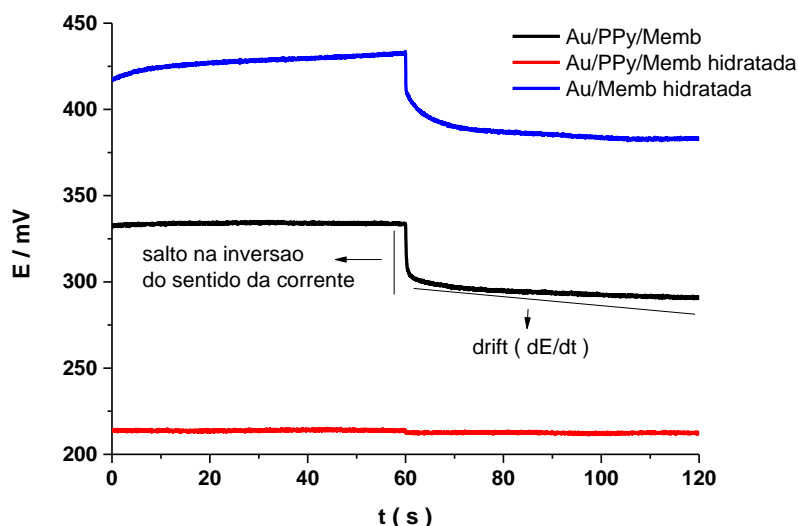


Figura 4.35 – Cronoamperograma efetuado por aplicação de dois pulsos de corrente, o primeiro com -1 nA durante 60 segundos, seguido de um pulso com 1 nA durante mais 60 segundos, para os diferentes eletrodos identificados na figura.

Pela análise dos cronoamperogramas observa-se que o eletrodo modificado com polipirrol e membrana seletiva de iões amónio hidratada é o que apresenta melhores resultados em relação aos restantes eletrodos, uma vez que o salto de potencial entre a aplicação de -1nA para 1nA é quase inexistente, indicando que a resistência da membrana é quase nula, bem como a inexistência de *drift* de potencial tanto na aplicação de -1nA como de 1nA indicando grande estabilidade do eletrodo, verifica-se também a importância do processo de hidratação uma vez que os resultados são bastante distintos. A partir destes ensaios é possível verificar que o eletrodo com membrana seletiva de amónio sem condutor misto entre as camadas apresenta uma resposta mais lenta à aplicação de corrente, sendo possível verificar *drift* ao longo dos 60 segundos que precedem e procedem a inversão de corrente.

Os estudos realizados diretamente em amostras reais, vinho, revelaram que a utilização destas membranas não é exequível. Uma possível explicação poderá ser explicada pelo fato dos coeficientes de seletividade dos iões potássio e iões amónio serem bastantes próximos como se verifica pela observação da Figura 4.36, e sendo o vinho rico em iões potássio, resultado da adição de sais deste elemento durante o processo de fabrico. Estes muito provavelmente interferem na quantificação de iões amónio.

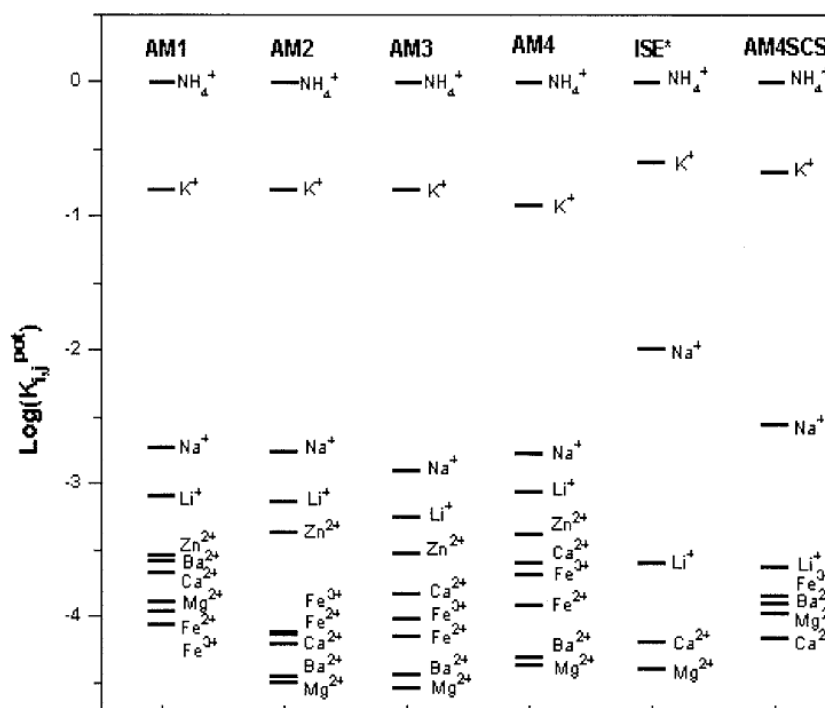


Figura 4.36 – Coeficientes de seletividade, $\log K_{\text{NH}_4, j}^{\text{pot}}$, para diferentes elétroodos seletivos de iões amónio reportados na literatura [60].

No âmbito do Bionitro no qual estes resultados foram desenvolvidos, estes elétroodos foram aplicados separando-se a amostra de vinho do sistema de deteção através de uma membrana permeável a gases por recurso a uma estrutura de microfluídicas.

4.4.2. Desenvolvimento de um método de detecção de azoto assimilável por medidas de fluorescência na plataforma Enosense®

Os resultados apresentados no subcapítulo anterior demonstraram alguma dificuldade de implementação do sistema de quantificação de azoto assimilável em vinho recorrendo ao eletrodo seletivo de iões amónio previamente desenvolvido.

No decorrer da leitura e estudo dos artigos científicos respeitantes à determinação de aminoácidos primários por métodos óticos constatou-se que a mesma metodologia, envolvendo os mesmos reagentes poderia ser empregue para a detecção de diferentes compostos de interesse analítico em matrizes de vinho.

No esquema seguinte apresenta-se de forma ilustrativa as possibilidades de determinação de α -aminoácidos, iões amónio e sulfito, recorrendo ao mesmo reagente de partida (o-ftaldeído), quantificados pela absorvância ou fluorescência emitida por produtos de reação idênticos (isoindolos).

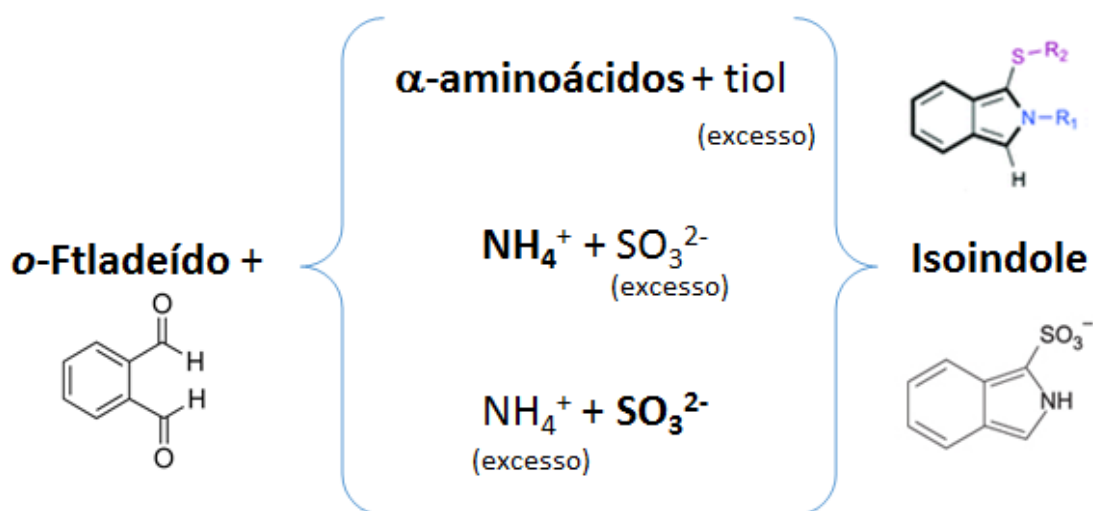


Figura 4.37 – Esquema representativo da possibilidade de detecção de diferentes compostos recorrendo à reação de o-ftaldeído com diferentes nucleófilos.

O princípio base na quantificação dos α -aminoácidos, iões amónio e sulfito é sempre idêntico alterando-se apenas o nucleófilo que reage (tiol ou sulfito) e colocando o mesmo em excesso no caso da determinação de aminoácidos e iões amónio.

Neste subcapítulo desenvolveram-se duas metodologias analíticas para a determinação de dois compostos, azoto amoniacal e aminoácidos primários, usando a mesma plataforma de análise, baseada em medidas de fluorescência.

A opção por métodos baseados em fluorescência em detrimento de medidas de absorvância decorre do fato de a plataforma de detecção desenvolvida pela empresa fazer uso de um led a 365 nm para a detecção de outros compostos. A utilização deste led tal como será demonstrado posteriormente não permite realizar medições de absorvância dos isoindolos ao limites de detecção desejados. Em contrapartida, técnicas analíticas baseadas em fluorescência são cerca de 1000 vezes mais

sensíveis que as correspondentes baseadas em medidas espectrofotométricas [61]. A razão para a elevada sensibilidade está normalmente atribuída ao fato de o sinal de emissão medido estar bem acima do sinal de fundo resultando num aumento do limite de deteção com a possibilidade de se usar menor amostra.

Existe ainda uma vantagem significativa nestes métodos, nomeadamente no que respeita à determinação de iões amónio, uma vez que será possível a determinação desta não recorrendo a métodos enzimáticos. Desta forma não só o custo final por análise diminui de forma significativa como os problemas associados à estabilidade a longo prazo das biomoléculas é eliminado.

A avaliação da qualidade dos resultados obtidos com as novas metodologias desenvolvidas foi efetuada por comparação com procedimentos utilizando métodos tradicionais de análise.

4.4.2.1. Estado da arte na determinação de iões amónio e aminoácidos primários através da sua reação com OPA

No início dos anos 70 foi identificado um produto da reação entre o composto *orto*-ftalaldeído (OPA), um tiol e aminoácidos primários, isoindolo [62], interessante devido à sua fluorescência quando excitado com luz de comprimento de onda na ordem dos 330 nm mas também porque se mostrou estável espectrofotometricamente permitindo observar proporcionalidade entre a luz absorvida e a concentração de aminoácidos [63], Figura 4.38.

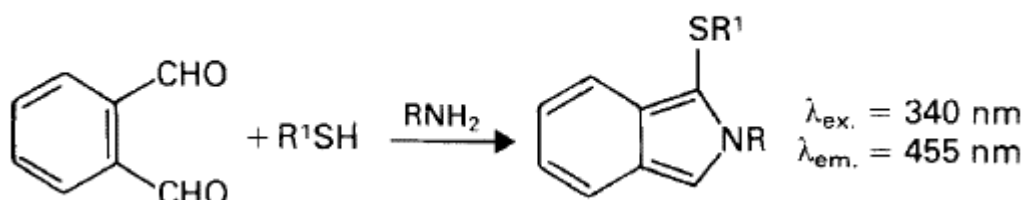


Figura 4.38 – Esquema reacional da OPA/tiol com uma aminoácido primário em meio básico [64].

Recorrendo à formação destes derivados, variando a temperatura da reação e o método de deteção de UV, estes foram utilizados na determinação de concentração de tiol em produtos farmacêutico [65], na quantificação do número de grupos amina em proteínas [66] em urina e plasma [61] e noutros fluidos biológicos [67] [63]. O uso da propriedade de fluorescência dos isoindolos é bastante utilizado em técnicas cromatográficas recorrendo a diferentes tióis, tais como 2-mercapto etanol [68], ácido 3-mercaptopropionico [69] entre outros [70].

Estes compostos tornaram possível uma evolução nas técnicas de quantificação de aminoácidos primários [12], iões amónio [71] e sulfitos [72] na indústria agroalimentar.

Como referido na introdução, Dukes and Butzke [12], desenvolveram um método que intitularam de NOPA (*nitrogen by OPA*) para detetar aminoácidos primários

através da formação de derivados na reação do azoto alfa dos aminoácidos com OPA e Acetilcisteína (NAC) em sumo de uva/mosto. Neste método somente aminoácidos primários reagem formando o isoindolo de interesse à exceção da prolina e hidroxiprolina que não permite a sua deteção através desta técnica. A prolina é frequentemente abundante no mosto de vinho [73] contudo devido ao fato de esta não ser assimilada pelas leveduras no processo de fermentação alcoólica [74] não constitui um problema para a técnica na determinação de aminoácidos assimiláveis. Esta técnica apareceu tornando a quantificação por espectroscopia de UV mais rápida e simples que a efetuada recorrendo a cromatografia, tornando possível a existência de kits comerciais para a determinação de aminoácidos primários na indústria vitivinícola recorrendo a espectrofotómetros.

A reação da OPA foi bastante estudada com diferentes tióis na presença de aminoácidos primários, mas um outro agente redutor revela grande importância para a indústria, o sulfito. Utilizando o sulfito com agente redutor torna-se possível efetuar a determinação de iões amónio [75] [76], verificando-se que o composto reage com iões amónio e não sofre interferência de aminoácidos primários na solução. Tendo ainda a vantagem de que com o sistema NH_4^+ -OPA- SO_3^{2-} é possível detetar iões amónio ou detetar sulfito [77] [72] pela mesma metodologia, são dois elementos de relevo na indústria vinícola.

Para a utilização destes sistemas é necessário não só conhecer o espectro de absorção do composto, por forma a selecionar o comprimento de onda ideal para a fonte de excitação, mas também o espectro de emissão dos isoindolos formados. Os espectros obtidos para o sistema α -aminoácidos-OPA-NAC, tal como o espectro relativo à emissão do led, está representado na Figura 4.39.

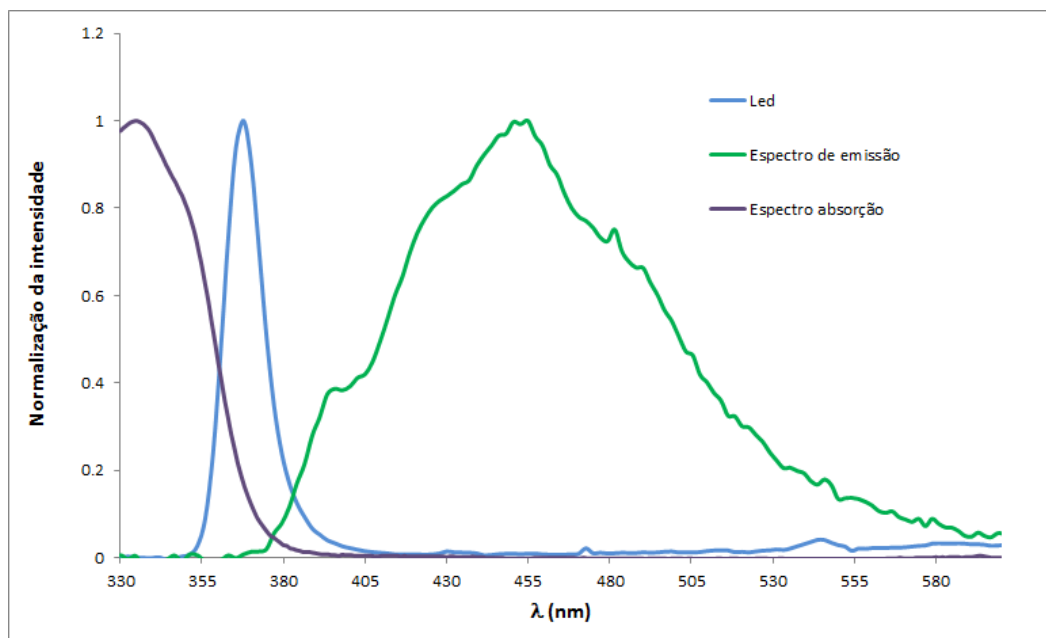


Figura 4.39 – Espectro de absorção e emissão do complexo formado na reação α -aminoácidos-OPA-NAC e espectro de emissão do led.

Os espectros registados demonstram que um led com pico de emissão a 365 nm permite a excitação do produto da reação, devido à sua sobreposição com o respetivo

espectros de absorção, e que as medidas de fluorescência se deverão efetuar no máximo do espectro de emissão, 450 nm para o sistema α -aminoácidos-OPA-NAC. Resultados idênticos foram obtidos para o sistema NH_4^+ -OPA- SO_3^{2-} sendo neste caso a aquisição do sinal de emissão efetuada 421 nm.

4.4.2.2. Plataforma Enosense®

A plataforma Enosense® vem sendo construída ao longo do tempo consoante as necessidades impostas pelos parâmetros a analisar e pela sua metodologia.

A base de construção baseia-se em algumas premissas fundamentais impostas pelo rumo que a empresa pretende seguir:

- Permitir realizar medidas de absorvância
- Sistema de emissão de luz e de aquisição
- Sistema que permita analisar diferentes tipos de chip e compostos
- Sistema de mistura de líquidos
- Sistema de bomba e válvula permitindo controlo de microfluídica.

O sistema construído neste momento, contempla a introdução de uma estrutura de microfluídica para cada parâmetro, previamente cheio com os reagentes necessários. Dentro desse sistema é realizado de forma autónoma a alíquota exata da amostra, permitindo que seja introduzida amostra em excesso e o sistema faz a medição de uma quantidade fixa a introduzir na reação. O líquido é levado através de sistema de bombas e válvulas a um reator onde é homogeneizado recorrendo a um sistema de mistura desenvolvido pela empresa que está em fase de patenteamento. Após homogeneização da solução esta é direcionada para um canal de medida onde é determinada a absorvância da solução, neste momento o equipamento está preparado para obter a absorvância a um único comprimento de onda, 365 nm, sendo a fonte de luz composta por um led a esse comprimento de onda, contudo o equipamento está preparado para uma fácil e rápida mudança do led em questão para outro de diferente comprimento de onda, bem como para no futuro incluir vários leds de diferentes comprimentos de onda. O sistema de aquisição de luz é composto por um espectrofotómetro miniatura da marca Hamamatsu modelo C12666MA, permitindo deste modo a ausência de filtros e aquisição a um comprimento de onda fixo.

4.4.2.3. Detecção de aminoácidos primários em amostras de vinho por fluorescência

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do novo método serão comparados com os resultados obtidos utilizando o kit comercial da empresa Megazyme (K-PANOPA³), este kit comercial tem em conta a absorção dos isoindolos a 340 nm.

³ <https://secure.megazyme.com/Primary-Amino-Nitrogen-Assay-Kit>

Na Figura 4.40 é possível observar em melhor detalhe o espectro de absorção do produto da reação para o sistema α -aminoácidos-OPA-NAC. A variação acentuada de absorvância registada entre o máximo do pico de absorção, a cerca de 335 nm e o comprimento de onda selecionado e fixo no equipamento para a fonte de luz (365 nm \pm 10 nm) explica a impossibilidade de usar o equipamento Enosense®, nesta configuração, para medidas de absorvância deste composto. Isto é, o coeficiente de extinção do isoindolo formado, a 365 nm, é demasiado baixo para permitir limites de deteção no intervalo desejado.

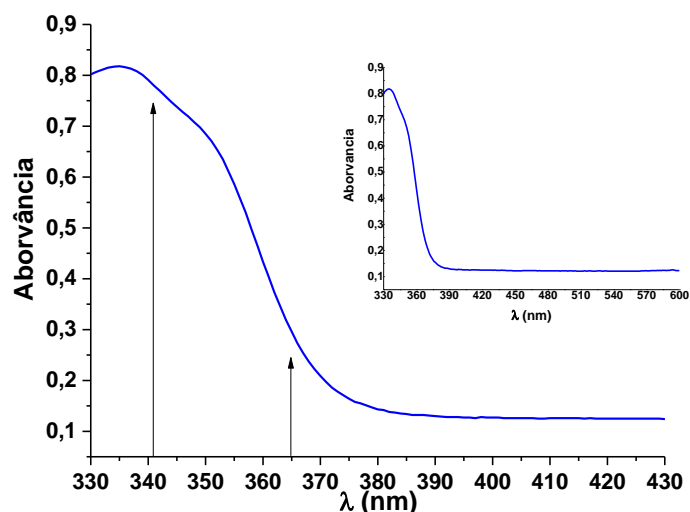


Figura 4.40 – Espectro de absorção de uma mistura de OPA-NAC-Aminoácidos primários. representação gráfica principal um zoom na área de comprimentos de onda de interesse, e a representação gráfica inserida apresenta o espectro geral entre 330 e 600 nm.

O estudo da aquisição de fluorescência proveniente da excitação do isoindolo a 365 nm foi efetuado na plataforma Enosense®, os primeiros ensaios realizados consistiram no registo do sinal de fluorescência obtido com a variação da concentração de isoleucina, cujos resultados se apresentam na figura seguinte.

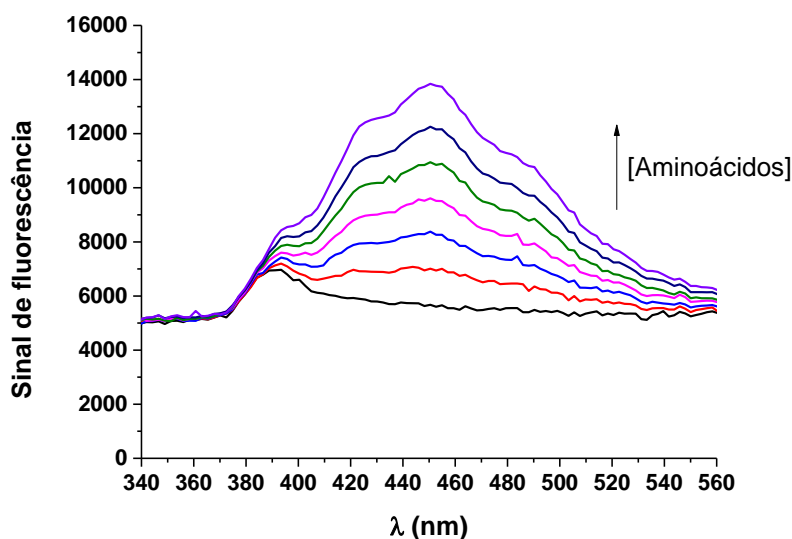


Figura 4.41 – Espectro de emissão de fluorescência da reação de OPA-NAC-Isoleucina para diferentes concentrações de isoleucina em solução.

Com o aumento sucessivo de isoleucina em solução observa-se um correspondente aumento da intensidade de luz proveniente da fluorescência do composto. A linha de base de sinal de fundo em torno das 5000 unidades relativas é devido à necessidade de se utilizar tempos de exposição do espectrofotômetro elevados (3s), necessário à recolha do sinal ótico pelo mesmo.

Para a comparação de resultados entre os dois métodos, fluorescência e método tradicional por absorvância, decidiu-se determinar os aminoácidos presentes em 5 vinhos distintos, 4 modelos de vinho provenientes da empresa Tritivan (AA1-AA4) e um vinho comercial da marca Conde Noble 2013 adquirido num supermercado local. Desta forma se existir uma influência da composição da matriz a mesma será revelada pela análise em diferentes vinhos.

A cada vinho foi adicionado uma quantidade fixa de aminoácidos (28 e 42 ppb) sendo calculada a percentagem de recuperação, de modo a verificar o efeito matriz. De realçar que os valores absolutos de concentração de aminoácidos determinados, obtidos pela realização do método de forma tradicional (Kit comercial com medidas de absorvâncias) foram considerados os corretos, e a partir dos quais se efetuaram os cálculos de recuperação.

Determinação da quantidade de aminoácidos primários presentes em cada amostra de vinho utilizando o Kit K-Panopa da Megazyme.

As concentrações de aminoácidos primários presentes em cada vinho foram calculadas utilizando o kit comercial através de duas metodologias: a primeira, utilizando as informações diretamente do manual de instruções do kit; a segunda, realizando uma curva de calibração com o padrão de isoleucina fornecido no kit. O objetivo destas duas metodologias é de verificar o funcionamento do kit bem como os possíveis erros existentes entre os dois métodos de cálculo.

O processo de medida descrito pela Megazyme consiste nos seguintes passos:

1. Medição do branco (substituição da amostra por água) antes ($A1_{\text{Branco}}$) e depois ($A2_{\text{Branco}}$) de adicionar a solução de OPA.
2. Realizar o mesmo procedimento com a amostra, medição de absorvância antes ($A1_{\text{Amostra}}$) e depois ($A2_{\text{Amostra}}$) de adicionar a solução de OPA.

A absorvância da amostra é calculada do seguinte modo:

$$\text{Absorvância} = (A2_{\text{Amostra}} - A1_{\text{Amostra}}) - (A2_{\text{Branco}} - A1_{\text{Branco}}) \quad (4.10)$$

Na tabela seguinte são apresentados os valores de absorvância obtidos para o branco e diferentes tipos de vinho não diluídos e para os vinhos diluídos duas vezes (e.x. AA1 2x) com adição de diferentes quantidades de aminoácidos (28 e 42 ppb), de modo a testar a taxa de recuperação.

Tabela 4.7 – Valores de absorvância para a determinação de aminoácidos primários utilizando o kit da Megazyme, no ensaio em branco e para os ensaios nos diferentes tipos de vinho.

			Identificação amostra	Absorvancia (A1)	Absorvancia (A2)	Δ Absorvancia
Branco			AA1	0,282	0,521	0,210
			AA1 2x	0,139	0,263	0,095
			AA1 2x (28 ppb)	0,141	0,493	0,323
			AA1 2x (42 ppb)	0,139	0,600	0,432
			AA2	0,244	0,643	0,370
			AA2 2x	0,127	0,334	0,178
			AA2 2x (28 ppb)	0,131	0,576	0,416
			AA2 2x (42 ppb)	0,13	0,687	0,528
			AA3	0,14	0,479	0,310
			AA3 2x	0,079	0,269	0,161
			AA3 2x (28 ppb)	0,079	0,504	0,396
			AA3 2x (42 ppb)	0,078	0,609	0,502
			AA4	0,173	0,731	0,529
			AA4 2x	0,093	0,380	0,258
			AA4 2x (28 ppb)	0,093	0,610	0,488
			AA4 2x (42 ppb)	0,093	0,720	0,598
			V.Conde	0,266	0,917	0,622
			V.Conde 2x	0,139	0,472	0,304
			V.Conde 2x (28 ppb)	0,141	0,703	0,533
			V.Conde 2x (42 ppb)	0,142	0,827	0,656

			A1	A2
1	0,016	0,047		
2	0,016	0,044		
3	0,016	0,044		
Média	0,016	0,045		

Para o cálculo da concentração de aminoácidos primários em mg/L aplica-se a seguinte formula:

$$[Aminoácidos\ primários](mg/L) = \frac{V \times Mw \times 1000}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta Absorvancia \quad (4.11)$$

Em que:

V = Volume total (mL)

Mw = massa molecular azoto (g/mol)

ϵ = Coeficiente de extinção molar do isoindolo a 340 nm ($\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d = percurso otico (cm)

v = volume de amostra (mL)

$$[Aminoácidos\ primários](mg/L) = \frac{0.315 \times 14.01 \times 1000}{6803 \times 1 \times 0.005} \times \Delta Absorvancia \quad (4.12)$$

$$[Aminoácidos\ primários](mg/L) = 129.74 \times \Delta Absorvancia \quad (4.13)$$

A partir dos valores de absorvância obtidos e recorrendo à expressão de cálculo apresentada no parágrafo anterior foram obtidos os seguintes valores de concentração para os diferentes vinhos.

Tabela 4.8 – Valores de aminoácidos assimiláveis determinados recorrendo ao kit Megazyme para os diferentes vinhos (esquerda) e para os vinhos diluídos com adição de padrão para o estudo da recuperação.

		Recuperação		
		[] mg/L	%	
		mg/L		
		12,3		
AA1 2x (28 ppb)		41,7	29,5	105%
AA1 2x (42 ppb)		55,8	43,5	104%
		23,0		
AA2 2x (28 ppb)		53,8	30,8	110%
AA2 2x (42 ppb)		68,2	45,2	108%
		20,8		
AA3 2x (28 ppb)		51,2	30,4	108%
AA3 2x (42 ppb)		64,9	44,1	105%
		33,3		
AA4 2x (28 ppb)		63,1	29,7	106%
AA4 2x (42 ppb)		77,3	43,9	105%
		39,3		
V.Conde 2x (28 ppb)		68,9	29,6	106%
V.Conde 2x (42 ppb)		84,8	45,5	108%

Identificação vinho	[] mg/L
AA1	27,1
AA2	47,8
AA3	40,1
AA4	68,4
V.Conde	80,4

Pela observação da Tabela 4.8 acima apresentada, verifica-se que não existe interferência da matriz, pois apresenta boa recuperação das quantidades adicionadas aos vinhos, em média obteve-se recuperações de $107\% \pm 3\%$.

De modo a perceber os desvios que podem afetar o ensaio direto do K-Panopa da Megazyme, foram calculados as mesmas concentração mas desta vez através da recta obtida numa curva de calibração efetuada diluindo o padrão proveniente no kit. A recta de calibração é apresentada na seguinte figura.

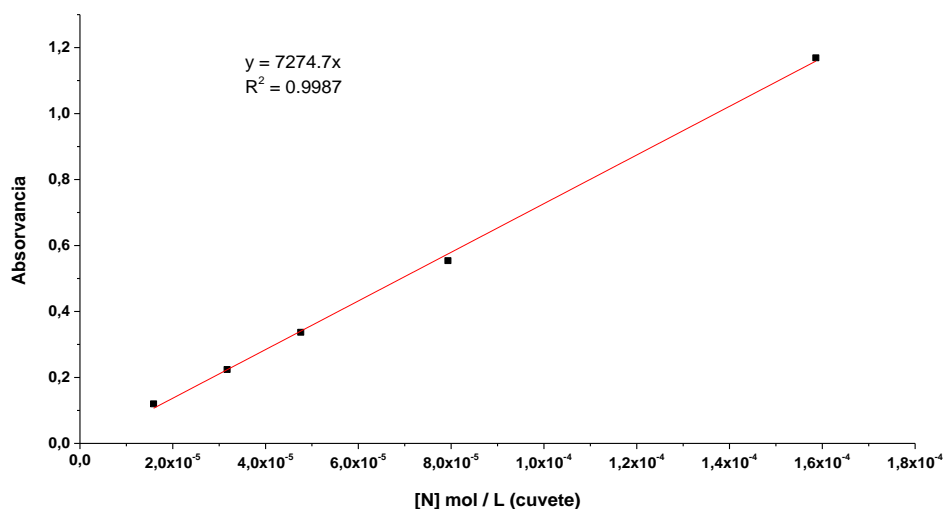


Figura 4.42 – Curva de calibração realizada para o ensaio de NOPA realizado com o kit K-Panopa da megazyme.

A determinação da concentração de aminoácidos assimiláveis recorrendo à curva de calibração obtida anteriormente é apresentado na forma de tabela.

Tabela 4.9 – Valores de aminoácidos assimiláveis determinados recorrendo à curva de calibração efetuada com o kit K-Panopa da Megazyme para os diferentes vinhos (esquerda) e para os vinhos diluídos com adição de padrão para o estudo da recuperação.

Identificação vinho	[] mg/L	Recuperação			
		[] mg/L	mg/L	%	
AA1	25,5	AA1 2x	11,5		
AA2	44,9	AA1 2x (28 ppb)	39,2	27,7	99%
AA3	37,6	AA1 2x (42 ppb)	52,4	40,9	97%
AA4	64,2	AA2 2x	21,6		
V.Conde	75,5	AA2 2x (28 ppb)	50,5	28,9	103%
		AA2 2x (42 ppb)	64,1	42,5	101%
		AA3 2x	19,5		
		AA3 2x (28 ppb)	48,1	28,5	102%
		AA3 2x (42 ppb)	60,9	41,4	99%
		AA4 2x	31,3		
		AA4 2x (28 ppb)	59,2	27,9	100%
		AA4 2x (42 ppb)	72,6	41,3	98%
		V.Conde 2x	36,9		
		V.Conde 2x (28 ppb)	64,7	27,8	99%
		V.Conde 2x (42 ppb)	79,6	42,7	102%

Os resultados obtidos parecem indicar que a determinação utilizando o sistema direto apresenta valores por excesso de 6% indicando uma variação entre +1.65 mg/L para os valores de concentração mais baixos e +4.9 mg/L para as concentrações mais elevadas.

A diferença de 6% nas concentrações é devida ao declive da recta que é de 7274.7 enquanto o utilizado para o cálculo pelo método direto é de 6803.

Apesar de a aproximação mais correta ser a de utilizar os resultados provenientes da curva de calibração, na prática o que os utilizadores finais usam é o método direto, de forma que serão esses os valores contra os quais o novo método se ira comparar.

Determinação da quantidade de aminoácidos primários presentes em cada vinho utilizando o método de deteção por fluorescência.

A preparação dos ensaios é exatamente igual ao kit comercial da Megazyme, a única diferença passa pelo sistema de aquisição de sinal. Desta forma foi efetuada uma reta de calibração, Figura 4.41, utilizando o padrão fornecido pela Megazyme (isoleucina 140 mg/L). Na Tabela 4.10 são apresentados os valores de concentração para cada ponto da recta e os respetivos sinais de fluorescência. A curva de

calibração foi efetuada com tempo de exposição de 5000 μ s e intensidade do led de 255 (máximo).

Tabela 4.10 – Concentração e absorvância obtida para cada ponto da curva de calibração efetuada com aquisição de sinal por fluorescência.

Solução nº	diluição	[N] mg/L	[N] mg/L (Cuvete)	Sinal
1	10	14	0,222	627
2	5	28	0,444	1134
3	3,3	42	0,667	2036
4	2	70	1,111	3223
5	1	140	2,222	6312

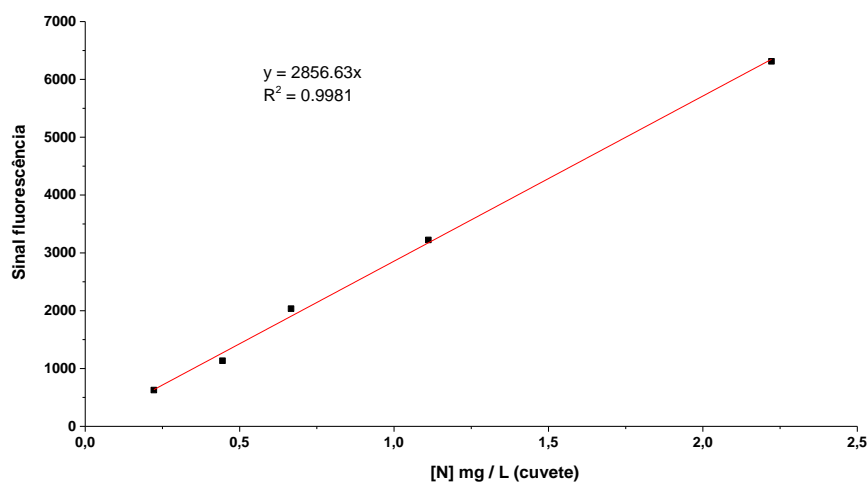


Figura 4.43 – Curva de calibração do ensaio NOPA com aquisição por fluorescência e solução padrão de isoleucina.

Utilizando a recta de calibração anterior, os valores obtidos na determinação de aminoácidos primários para os diferentes vinhos são apresentados na Tabela 4.11 enquanto os valores referentes às recuperações obtidas na adição de uma quantidade fixa de aminoácidos às soluções de vinho diluído 2 vezes são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.11 – Determinação de aminoácidos primários para os diferentes vinhos utilizando os dois métodos de determinação, a aquisição de sinal do NOPA por fluorescência e a K-Panopa.

Identificação vinho	Sinal	[] mg/L	K-Panopa	Diferença entre métodos
AA1	793,6	17,50	27,14	35%
AA2	1464,6	32,30	47,81	32%
AA3	1214	26,78	40,06	33%
AA4	1908	42,08	68,36	38%
V.Conde	2510	55,36	80,38	31%

Tabela 4.12 – Valores de concentração determinados pelo método de NOPA com aquisição por fluorescência para os vinhos diluídos e para os ensaios de adição de quantidade fixa de padrão com as respectivas recuperações.

Identificação amostra	[] mg/L	Recuperação	
		mg/L	%
AA1 2x		11,46	
AA1 2x (28 ppb)	39,23	27,77	99%
AA1 2x (42 ppb)	50,74	39,28	94%
AA2 2x		20,46	
AA2 2x (28 ppb)	45,45	24,99	89%
AA2 2x (42 ppb)	59,52	39,06	93%
AA3 2x		17,18	
AA3 2x (28 ppb)	43,89	26,71	95%
AA3 2x (42 ppb)	56,36	39,17	93%
AA4 2x		28,76	
AA4 2x (28 ppb)	54,55	25,78	92%
AA4 2x (42 ppb)	71,16	42,39	101%
V.Conde 2x		37,06	
V.Conde 2x (28 ppb)	59,44	22,39	80%
V.Conde 2x (42 ppb)	78,94	41,89	100%

Segundo os dados da Tabela 4.11 verifica-se que o valor determinado para a concentração de aminoácidos livres utilizando o método de aquisição de fluorescência apresenta valores 34% abaixo do obtido utilizando o kit da Megazyme, contudo os valores de recuperação obtidos situam-se nos 94% (Tabela 4.12), indicando que não existe interferência da matriz.

Estes resultados parecem indicar que o sistema responde em relação à adição de padrão (isoleucina), mas não responde da mesma maneira para os aminoácidos presentes no vinho. Tal resposta levou-nos a questionar o porquê da isoleucina como referencia no K-Panopa e a perceber a razão da sua escolha.

O kit comercial K-Panopa da Megazyme tem por base científica o trabalho desenvolvido por Dukes and Butzke [12], os quais selecionaram o padrão ideal para uma mistura de aminoácidos da seguinte forma:

$$Abs_T = \sum_{i=1}^n Abs_i = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i \quad (4.14)$$

sendo:

Abs_T = absorvância total do padrão,

Abs_i = absorvância individual de cada aminoácido,

ε_i = absortividade molar de cada aminoácido

c_i = concentração molar aminoácido.

Sabendo a composição típica em aminoácidos primários das amostras, determinadas por ensaios de HPLC, calcularam a Abs_T utilizando estas mesmas concentrações e utilizando coeficientes molar da literatura para cada aminoácido. Desta forma os resultados demonstraram que a isoleucina seria o padrão ideal pois a sua absorvidade molar é idêntica ao valor médio obtido para os diversos mostos e sumos de uva, revelando uma proporcionalidade e linearidade ($y=1.00x$; $R^2 = 1.00$) em relação aos ensaios utilizando HPLC [12].

Compreendendo o conceito associado à escolha da isoleucina como padrão para o NOPA e sabendo que não existe relação direta entre a absorvidade molar e a fluorescência relativa [78] torna-se perceptível os resultados obtidos no cálculo dos aminoácidos primários com recurso a fluorescência. A recuperação do sinal proveniente da adição de isoleucina coincide com a reta feita com isoleucina como padrão (valor médio 94%) contudo na determinação dos diversos aminoácidos a isoleucina não é representativa dos diversos aminoácidos presentes. De modo a verificar a possibilidade de utilização de um novo padrão representativo em fluorescência utilizou-se uma solução de aminoácidos, Tabela 4.13, descrita como representativa da maior parte dos mostos apresentada na literatura [12].

Tabela 4.13- Constituintes de uma solução de aminoácidos utilizada como padrão, respetiva massa de cada constituinte, concentração e concentração em azoto.

Aminoácido	m_{exp}	[Aminoácidos] mM	[Aminoácidos] mg/L	[Aminoácidos] mg/L em N
Arginina	82,4	4,68	815,76	65,56
Alanina	26,2	2,90	258,07	40,55
Serina	13,8	1,30	136,62	18,20
Glutamina	18,8	1,27	186,12	17,83
Treonina	14,5	1,20	143,55	16,86
Valina	7,1	0,6	70,29	8,4
Total		11,96	1610,41	167,40

Com a solução de aminoácidos efetuada com o intuito de servir de padrão, de concentração 167.4 mg em azoto /L, realizou-se as seguintes soluções presentes na Tabela 4.14 e a respetiva curva de calibração apresentada na Figura 4.44.

Tabela 4.14 – Valores da constituição de cada solução utilizada para efetuar a curva de calibração utilizando a solução de aminoácidos como padrão.

Solução nº	V_{total}	$V_{amostra}$	[N] mg/L	[N] mol/L	Sinal
1	311	1	0,538	$3,84 \times 10^{-5}$	1343
2	312	2	1,073	$7,66 \times 10^{-5}$	2643
3	313	3	1,604	$1,15 \times 10^{-4}$	3908
4	314	4	2,132	$1,52 \times 10^{-4}$	5311
5	315	5	2,657	$1,90 \times 10^{-4}$	6532
6	316	6	3,178	$2,27 \times 10^{-4}$	8140

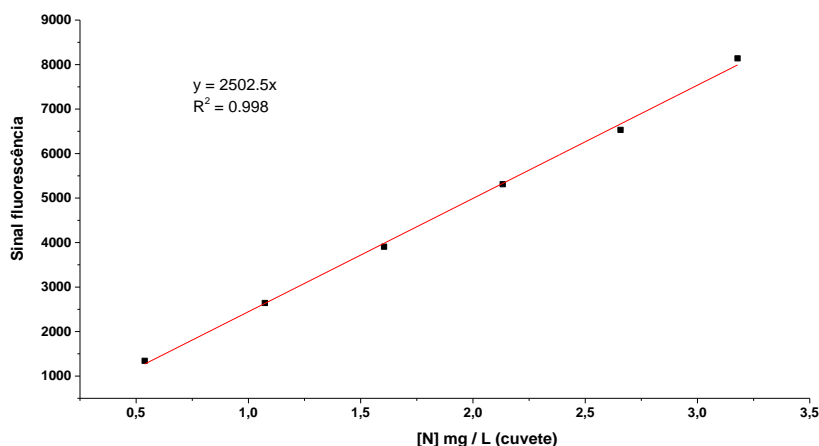


Figura 4.44 – Representação gráfica da curva de calibração efetuada com a solução de aminoácidos contendo 167,4 mg em N /L como padrão.

Pela observação da curva de calibração, Figura 4.44, realizada utilizando uma solução de aminoácidos como padrão e a apresentada na Figura 4.43 onde se usa a solução de isoleucina como padrão, é possível aferir pelo declive da recta que a solução de isoleucina apresenta uma fluorescência molar superior que a solução de aminoácido, sendo possível prever que os resultados no vinho estarão mais próximos com este padrão do que no padrão utilizado no NOPA.

Os mesmos vinhos foram analisados recorrendo a esta curva de calibração e o ensaio de recuperação foi efetuado somente para os vinhos não diluídos, uma vez que já tinha sido demonstrada a não existência de interferência da matriz na medição do correspondente sinal ótico. Na Tabela 4.15 são apresentados os valores de recuperação dos vinhos em relação ao K-Panopa.

Tabela 4.15 – Valores de concentração de aminoácidos assimiláveis utilizando os diferentes métodos de quantificação e os respetivos desvios entre os métodos.

Identificação amostra	V _{total}	V _{amostra}	Sinal	[N] mg/L	K Panopa	Diferença entre métodos
AA1	320	10	1802,6	23,055	27,1	15%
AA2	315	5	1652,6	41,612	47,8	13%
AA3	315	5	1302,6	32,799	40,1	18%
AA4	315	5	2321,6	58,458	68,4	14%
Vconde	315	5	2731,6	68,781	80,4	14%

Os valores obtidos aproximam-se dos valores do K-Panopa, com uma diferença entre métodos de cerca de 15%, Tabela 4.15, contudo a escolha da referência ainda não é a mais acertada para a quantificação por fluorescência. A falta de informação na literatura em relação à fluorescência molar relativa [78], em comparação com a tão estudada absorvidade molar, dificultam a tarefa na escolha do melhor aminoácido ou conjunto de aminoácidos para servir de referência para o teste.

A constância no desvio dos resultados face ao valor obtido pelo kit comercial, para os diferentes vinhos, permite afirmar que o método é válido e que um valor correto da concentração de aminoácidos é possível obter apenas multiplicando por um fator de correção, que contabilize a diferença entre o padrão isoleucina e a fluorescência molar real.

Na tabela e na representação gráfica da Figura 4.45 apresentam-se os valores de taxas de recuperação e a linearidade obtida entre os dois métodos, através da aplicação de uma constante de correção ($1/66 = 1.518$) aos valores de concentração obtidos por fluorescência com a isoleucina como padrão.

Tabela 4.16 – Valores de concentração de aminoácidos assimiláveis utilizando os diferentes métodos de quantificação e os respetivos desvios entre os métodos aplicando o fator de correção.

Vinho	[Aminoácidos] mg/L		Diferença entre métodos
	Fluorescência	K-Panopa	
AA1	26.57	27.14	-2%
AA2	49.04	47.81	+3%
AA3	40.65	40.06	+1%
AA4	63.89	68.36	-7%

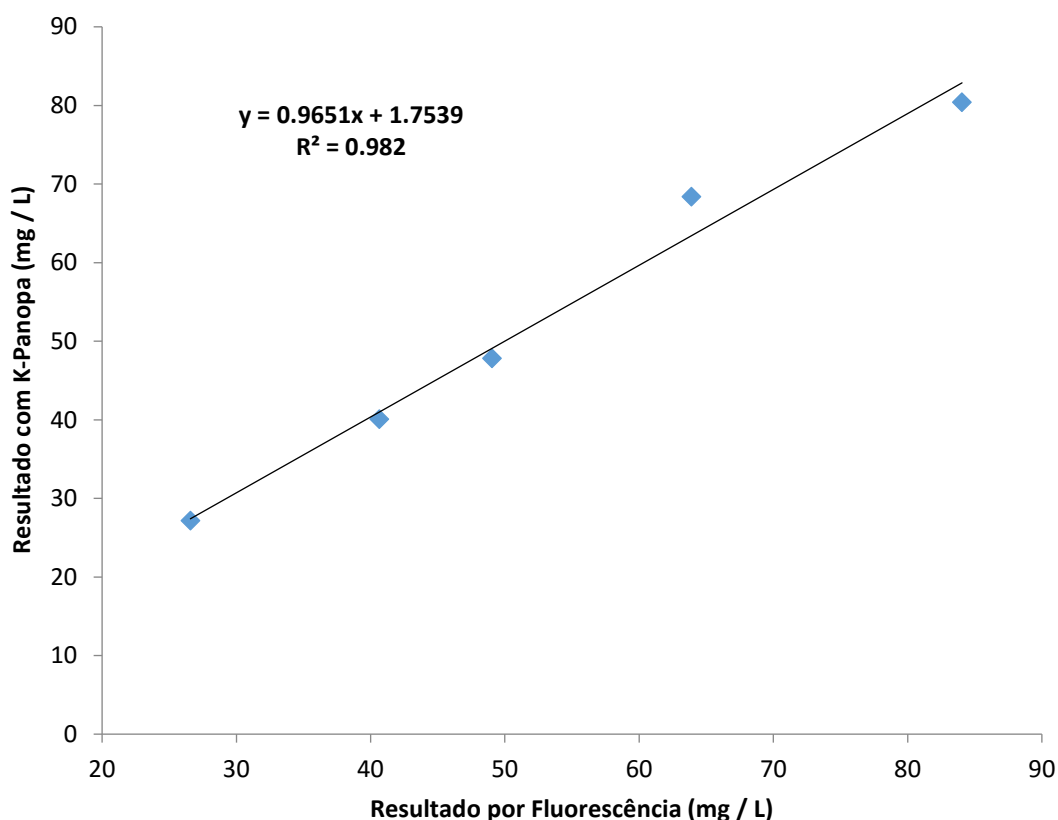


Figura 4.45 – Correlação obtida entre os resultados de concentração de α -aminoácidos determinados pelo kit comercial K-Panopa e os determinados por fluorescência, aplicando o fator de correção.

Os resultados indiciam que por uma simples correção matemática, é possível ajustar a diferença entre os métodos de forma a contabilizar a não idealidade da isoleucina como padrão de referência para as medidas de fluorescência.

Foram obtidas excelentes correlações entre os métodos para diferentes matrizes de vinho com valores dispersos entre os -2% e os 3 %. Exceção feita ao valor obtido para o vinho com a composição AA4 para o qual uma diferença mais acentuada foi observada, -7%, cuja causa não foi determinada.

A representação gráfica na Figura 4.45 é ilustrativa da linearidade obtida entre os dois métodos com uma correlação na ordem dos 0.98, a qual será de 1 se não se considerar o resultado obtido para o AA4.

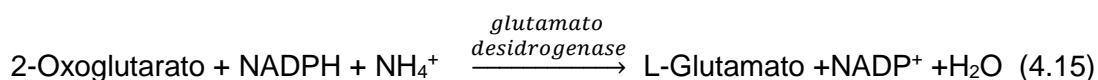
Apesar de os resultados indicarem que estatisticamente os métodos parecem ser equivalentes entre si, esta conclusão apenas poderá ser definitiva através da sua análise recorrendo a um maior número de análises de modo a obter valores com significado estatístico.

De enfatizar ainda, que estes estudos deverão ser validados em amostras de sumo de uva e mosto em fermentação, em detrimento do produto final, pois é nestas amostras que a concentração destes compostos é significativa. Estes estudos deverão ser acompanhados por quantificação dos aminoácidos individuais por medidas de HPLC e respetiva validação face a este método de referência. Na prática significa efetuar um estudo de validação semelhante ao desenvolvido para o método NOPA, por medidas de absorvância, por Dukes and Butzke [12].

4.4.2.4. Detecção de iões amónio em amostras de vinho por fluorescência

Tal como anteriormente para a determinação dos aminoácidos primários, também para a determinação de iões amónio no vinho se fez uso de um método convencional tradicionalmente empregue para realizar a validação do método desenvolvido.

O método usualmente empregue consistiu na utilização de um kit comercial, K-Amiar, da empresa Megazyme utilizando a seguinte reação enzimática.



A quantidade de NADP^+ formada é estequiométrica com a quantidade de iões amónio presente na amostra, desta forma mede-se o consumo de NADPH refletido num decréscimo de absorvância a 340 nm.

O método a desenvolver é baseado na reação de formação de isoindolos através da reação entre a OPA com sulfito e iões amónio, tal como previamente descrito. Os espectros de fluorescência obtidos para os isoindolos formados nestas condições encontram-se apresentados na Figura 4.46, quando efetuados com distintas concentrações de iões amónio.

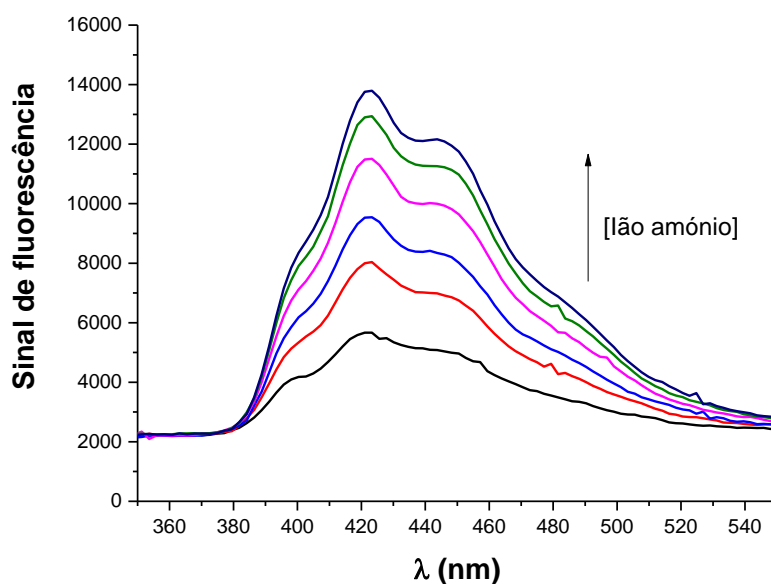


Figura 4.46 – Espectro de emissão de fluorescência do isoindolo resultante da reação do sistema NH_4^+ -OPA- SO_3^{2-} ilustrando a variação da concentração de íões amónio.

Os espectros de emissão registados, são muito idênticos na forma e número de bandas de emissão aos anteriormente obtidos na determinação de α -aminoácidos. Verifica-se no entanto um deslocamento global das bandas de emissão para valores inferiores de comprimentos de onda, com um máximo registado a 421 nm.

Ao longo deste estudo analisou-se um vinho pelos dois métodos de quantificação. O método enzimático K-Amiar foi utilizado como comparação de modo a auxiliar no desenvolvimento do ensaio de fluorescência. Após ajuste dos parâmetros essenciais e mediante apresentação de resultados comparáveis com o K-Amiar, um vinho será analisado em duplicado recorrendo aos dois métodos de modo a verificar o sucesso/insucesso do ensaio por fluorescência.

Determinação da quantidade de íões amónio presente no vinho comercial Conde Noble utilizando o Kit K-Amiar da Megazyme.

Para a realização do ensaio utilizando o kit comercial K-Amiar procedeu-se de forma análoga ao realizado para a determinação no kit K-Panopa utilizando a mesma metodologia para a determinação da absorvância e cálculo das concentrações.

Por uma questão de uniformização a concentração de íões amónio presente no vinho Conde Noble foi efetuada segundo as duas maneiras possíveis, recorrendo ao método de medida direto e à curva de calibração utilizando o padrão proveniente no kit da Megazyme (K-AMIAR), os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4.47 na forma de tabela de valores.

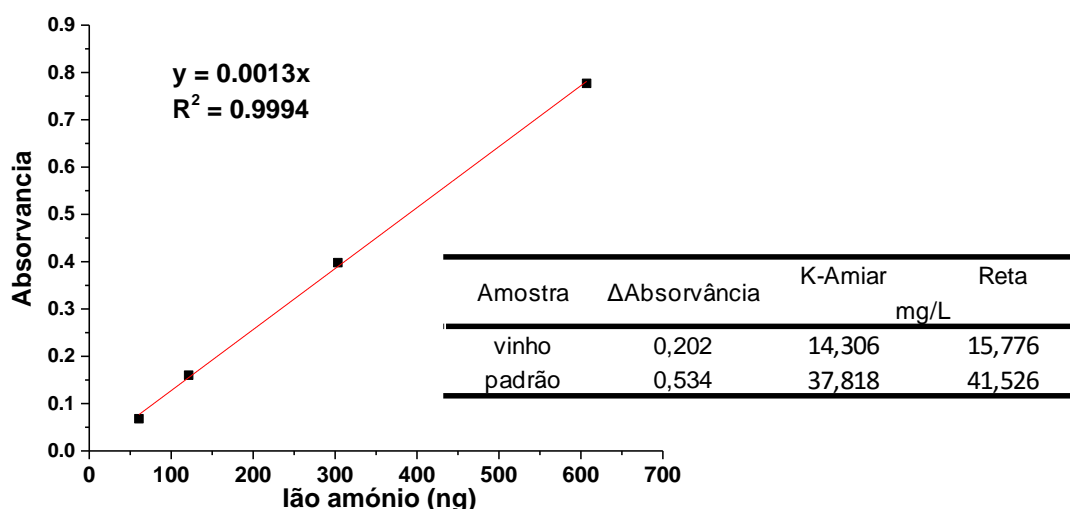


Figura 4.47 – Representação gráfica da curva de calibração realizada com o kit K-Amiar e respetiva tabela ilustrando os valores determinados para o vinho Conde Noble e para o padrão.

Tal como anteriormente, verifica-se que os resultados obtidos de acordo com a reta de calibração são superiores aos obtidos pelo método direto, a diferença entre os métodos corresponde a 9% de erro, valor alto, mas aceitável para o propósito das medidas. Tal como anteriormente o valor a ter em conta no auxílio do desenvolvimento do novo método de quantificação de iões amónio será o obtido diretamente com o K-Amiar.

Determinação da quantidade de iões amónio presente no vinho comercial Conde Noble com recurso ao método de quantificação por fluorescência em desenvolvimento.

Para a determinação de iões amónio com o método de deteção da fluorescência do isoindolo proveniente da reação $\text{NH}_4^+ \text{-OPA-SO}_3^{2-}$, por ser um método em desenvolvimento e ainda não ter sido reportado para o vinho, foi necessário testar condições da reação e adaptar as devidas concentrações com recurso a publicações existentes que utilizam o sistema idêntico para deteção de iões amónio em água [79] [80].

A gama de linearidade inicialmente testada foi escolhida em função da quantidade de iões amónio que normalmente pode estar presente ao longo do processo de vinificação, 20-400 mg / L. Na Figura 4.48 está representada uma tabela com os valores utilizados para efetuar a curva de calibração e a respetiva correção aos valores utilizando a recta de calibração ilustrada na mesma figura.

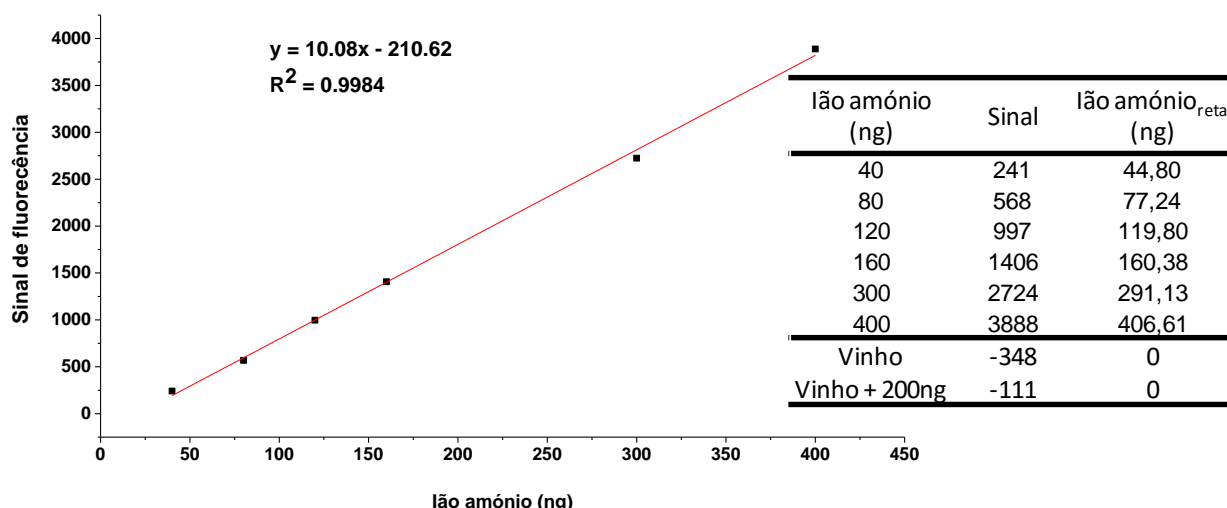


Figura 4.48 – Representação gráfica da curva de calibração realizada para quantificar íons amônio com recurso à fluorescência do isoindolos e respetiva tabela ilustrando os valores utilizados na curva e a posterior correção aos mesmos pela equação da reta.

Nas condições em que se realizaram estes ensaios, 150 segundos de reação com tempo de aquisição de 1000 μ s e led com intensidade máxima, verifica-se grande interferência por parte da matriz de vinho, pois o sistema não conseguiu detetar a presença de íons amônio no vinho nem em vinho com adição de 200ng de padrão de íons amônio. Neste caso o ensaio em si efetua uma diluição da amostra de 51x tendo em conta que se utiliza 2 μ L de amostra num volume total de 102 μ L.

Na tentativa de obtenção de uma maior amplitude de sinal entre os vários pontos, a reação foi medida ao final de 2 horas, e foi realizada uma nova curva de calibração para as novas condições, Figura 4.49. Estudos preliminares demonstraram que a reação termina num espaço temporal entre 1 e 2 horas e ao final de 3 horas o sinal proveniente do isoindolo formado na reação começa a diminuir de intensidade.

Tabela 4.17 –Valores das diversas soluções para a realização de uma curva de calibração para quantificação ao final de 2 horas de reação, valores de concentração obtidos para vinho e vinho com adição de padrão.

lão amónio (ng)	Sinal	lão amónio _{reta} (ng)		
48,56	1291	41,38		
97,11	3066	104,92		
194,22	5578	194,86		
291,34	8285	291,77		
388,45	10938	386,75	[lão amónio] ppm	Recuperação
Vinho	641	18,10	4,53	
Vinho + 194,22ng	3448	118,60	29,65	52%
(Vinho + 194,22ng) diluído 10 vezes	626	17,57	4,39	90%
Padrão 40 ppm	4722	164,21	41,05	103%

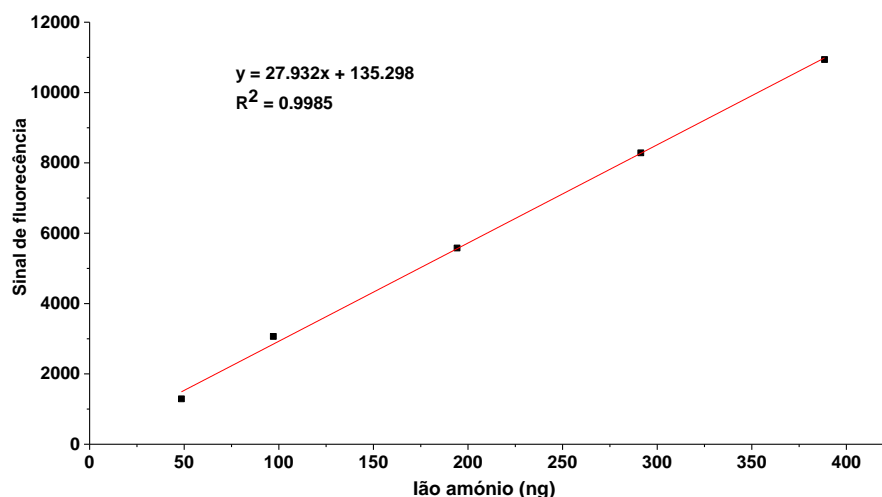


Figura 4.49 – Curva de calibração efetuada com a reação terminada, ao final de duas horas, para a quantificação de íons amônio.

Pela observação dos valores de recuperações apresentados na Tabela 4.17, verifica-se que nas mesmas condições de ensaio, à exceção do tempo de reação, verifica-se uma maior amplitude entre os sinais e adquirindo valores no término da reação é possível identificar íons amônio numa solução de vinho, contudo ainda existe notória interferência da matriz. Um vinho ao qual é adicionado 194.22 ng de padrão, somente é possível recuperar 50% do valor introduzido, a mesma solução diluída 10x torna possível uma recuperação na ordem dos 90%, contudo é um valor meramente ilustrativo pois a nível de sinal em bruto situa-se abaixo do limite da recta não sendo um valor representativo.

Tais resultados sugerem ser possível minimizar o efeito da matriz, diluindo a solução de vinho, mas para isso é imperativo deslocar a linearidade da curva de calibração para valores mais baixo de íons amônio.

Ao mesmo tempo que se altera a gama de linearidade mostrou ser de interesse para o desenvolvimento da técnica avaliar a influência da quantidade de sulfito, uma vez que as amostras de vinho normalmente contêm sulfito e poderá ser este o interferente na reação, bem como avaliar a seletividade do método em relação à reatividade com possíveis aminoácidos presentes no vinho.

Estudo da influência da concentração de sulfito e avaliação da interferência do sulfito presente no vinho na técnica de quantificação.

Na Tabela 4.18 são apresentadas as condições de ensaio e parâmetros do equipamento de aquisição, a quantidade de sulfito analisada está compreendida entre 0 e 90 µg.

Tabela 4.18 – Informação relativa às condições utilizadas para verificação da influência do sulfito na reação de formação do isoíndole.

Condições de ensaio	
Tampão (100mL)	0.3837g Hidróxido de sódio 0.8468g Ácido Bórico
[OPA]	8.9mM
Ião amônio	240ng
Tempo ensaio	1hora
Equipamento	
Tempo exposição	250 μ s
Intensidade led	255

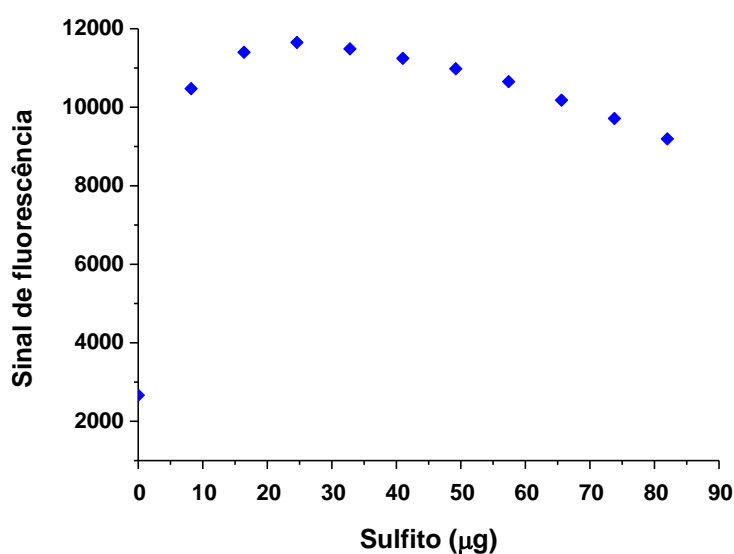


Figura 4.50 – Representação gráfica do sinal de fluorescência proveniente do isoíndole em função da quantidade de sulfito presente na reação.

Pela análise da representação gráfica ilustrada na Figura 4.50, verifica-se que existe fluorescência residual na ausência de sulfito na solução, o gráfico demonstra um máximo para 24.6 μ g de sulfito por ensaio. Cada ponto corresponde à adição de 8.2 μ g de sulfito na reação, verificando-se um decréscimo de sinal de 1% no ponto imediatamente após o máximo, 3% em cada um dos três pontos seguintes e 4% em cada um dos seguintes três. Pela análise da Tabela 4.19, onde é possível verificar o intervalo de sulfito presente no vinho e a possível contribuição do mesmo quer utilizando volume de amostra de 1 μ L para amostras mais concentradas em iões amônio, como utilizando um volume de 6 μ L para as amostras menos concentradas em iões amônio.

Tabela 4.19 – Estimativa de valores de sulfite presentes no vinho utilizando 1 ou 6 μ L de amostra.

	Amostra μ L	μ g
10mg / L	1	0.01
400mg / L	1	0.4
10mg / L	6	0.06
400mg / L	6	2.4

Sendo o intervalo de quantidade de sulfito presente no vinho é 0.01 a 2.4 μg , e através dos dados retirados da Figura 4.50 é possível aferir que o sulfito do vinho no máximo irá diminuir o sinal em 1%.

Estudo da influência da quantidade de aminoácidos e avaliação da interferência dos mesmos presentes no vinho na técnica de quantificação.

Na Tabela 4.20 são apresentadas as condições de ensaio e parâmetros do equipamento de aquisição, a quantidade de aminoácidos primários analisada está compreendida entre 0 e 8 μg .

Tabela 4.20 – Informação relativa às condições utilizadas para verificar a influência de aminoácidos na reação de formação do isoindolo.

Condições de ensaio	
Tampão (100mL)	0.3837g Hidróxido de sódio 0.8468g Ácido Bórico
[OPA]	8.9mM
Ião amónio	240ng
Sulfito	24.6 μg
Tempo ensaio	1hora
Equipamento	
Tempo exposição	250 μs
Intensidade led	255

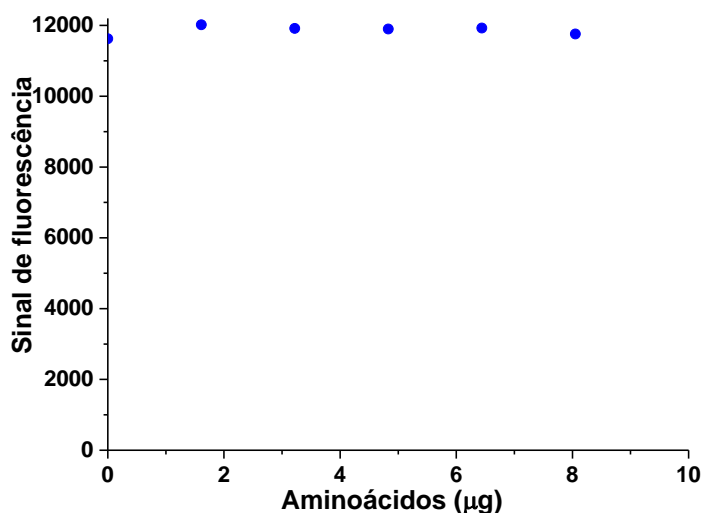


Figura 4.51 – Representação gráfica do sinal de fluorescência proveniente do isoindolo em função da quantidade de aminoácidos presentes na reação.

Os resultados apresentados na Figura 4.51 provam que não existe qualquer influência dos aminoácidos primários presentes no vinho no sinal de fluorescência na detecção de iões amónio. A variação existente no gráfico de aproximadamente $\pm 1\%$

está inerente ao erro associado ao método de aquisição. Estes resultados comprovam a seletividade do método, na ausência de NAC e presença de sulfito, somente os íons amônio reagem com a OPA para formar o isoindolo. As quantidades máximas e mínimas de aminoácidos primários provenientes do vinho são apresentadas na Tabela 4.21, sendo possível verificar que os valores estão compreendidos dentro do intervalo de estudo demonstrado na Figura 4.51, não afetando como tal o processo de medida.

Tabela 4.21 – Estimativa de valores de aminoácidos assimiláveis presentes no vinho utilizando 1 ou 6 μL de amostra.

	Amostra μL	μg
30mg / L	1	0.03
300mg / L	1	0.3
30mg / L	6	0.18
300mg / L	6	1.8

Após verificar a inexistência de interferência dos sulfitos e aminoácidos primários presentes no vinho, realizou-se a curva de calibração com quantidades de íons amônio a variar na solução entre 8 e 48 ng, Figura 4.52, segundo as condições descritas na Tabela 4.22.

Tabela 4.22 – Informação relativa às condições utilizadas na realização da curva de calibração para quantificação de íons amônio pelo método de detecção de fluorescência proveniente do isoindole formado na reação de íons amônio com sulfito e OPA.

Condições de ensaio	
Tampão (100mL)	0.3837g Hidróxido de sódio 0.8468g Ácido Bórico
[OPA]	8.9mM
Sulfito	24.6 μg
Tempo ensaio	10minutos
Equipamento	
Tempo exposição	200 μs
Intensidade led	255

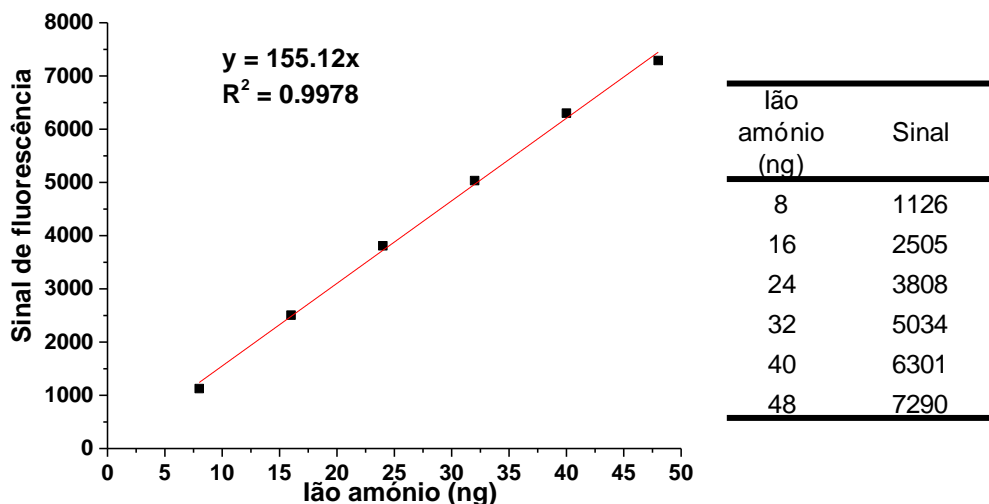


Figura 4.52 - Representação gráfica da curva de calibração realizada para quantificar íões amónio com recurso à fluorescência do isoíndole e respetiva tabela ilustrando os valores utilizados na curva o seu sinal

A curva de calibração realizada para quantidades de íões amónio mais baixas, permite analisar os valores reais de íões amónio no vinho.

É de realçar que a curva foi realizada ao final de 10 minutos de reação, de modo a não ter que adquirir valores somente no término da reação e assim tornar o ensaio mais apelativo comercialmente. Nesta caso o ensaio foi realizado com diluição do vinho 151x, e pelos resultados apresentados na Tabela 4.23 percebe-se que diluições de pelo menos 151x inibem a interferência do efeito matriz.

Tabela 4.23 – Valores obtidos na determinação de íões amónio em vinho com e sem adição de íões amónio e respetivas recuperações.

		Adição íon amónio (ng)	Sinal	Íon amónio (ng)	Recuperação	
Vinho	+	0	2055	13.25	ng	%
Vinho	+	16	4441	28.63	15.4	96%
Vinho	+	24	5319	34.29	21.0	88%
Vinho	+	32	7176	46.26	33.0	103%

Pela análise dos resultados presentes na Tabela 4.23 verifica-se que as recuperações apresentadas para as diversas adições de íões amónio no vinho apresentaram resultados bastante mais satisfatórios que os obtidos anteriormente, demonstrando que com as alterações efetuadas se inibiu a influência da matriz. A Tabela 4.24 apresenta o valor da concentração de aminoácidos presentes no vinho Conde Noble pela técnica comercial de quantificação K-Amiar da Megazyme e pelo método aqui desenvolvido para o efeito aplicando a deteção de fluorescência na formação do isoíndolo na reação de NH_4^+ -OPA- SO_3^{2-} .

Tabela 4.24 – Resultados obtidos na quantificação de íões amónio pelos dois métodos descritos, e o erro do método desenvolvido em relação ao comercial

	Fluorescência mg / L	K-AMIAR	Diferença entre métodos
Vinho	13.248	14.306	-7%

Os valores determinados pelas duas técnicas apresentam um erro entre elas de 7%, sendo que a deteção por fluorescência apresenta valor menor, este valor é considerado como aceitável pois a diferença entre 13.248 e 14.306 mg / L na indústria vinícola é perfeitamente desprezável. Contudo é necessário verificar o erro associado para concentrações de íões amónio elevadas como por exemplo em mostos e não em vinhos.

4.5. Conclusões

Ao longo deste capítulo desenvolveram-se sensores e metodologias para a quantificação analítica de compostos de interesse para a indústria agroalimentar e em particular para a indústria vitivinícola. O trabalho proposto incidiu na determinação do pH, iões amónio e aminoácidos primários presentes em soluções de vinho.

A determinação do pH recorreu ao desenvolvimento de um eléctrodo de pH baseado em óxidos mistos de irídio, obtidos por via eletroquímica. A opção pela medição do pH recorrendo a um eléctrodo de estado sólido deve-se à sua maior facilidade de posterior miniaturização e como tal incorporação no analisador portátil que a empresa se encontra a desenvolver.

Os filmes de óxido de irídio foram depositados em superfícies de ouro recorrendo a métodos eletroquímicos (potenciodinâmicos e galvanostáticos). O crescimento dos filmes foi otimizado de modo a obter uma elevada estabilidade dos filmes depositados e tempos curtos de resposta, tendo-se revelado a deposição galvanostática a 0.1 mA/cm² e com carga de deposição de 100 mC/cm² como a mais indicada.

A resposta ao pH observada para estes filmes teve um comportamento *supra-Nernsteniano*, com valores de 70 mV por unidade de pH, mas de acordo com o reportado na literatura. Quando testados em soluções de tampão universal os mesmos manifestam excelente linearidade ($R^2=0.9994$) para uma gama de pH compreendida entre 2 e 7.

A aplicação dos eléctrodos construídos na medição do pH em amostras de vinho, revelou uma interferência significativa de espécies redox presentes nestas amostras, impossibilitando a estabilização do potencial de circuito aberto ao longo do tempo, e consequente medição precisa do pH do mesmo. Na tentativa de minimizar a ação dos interferentes, foram depositadas diferentes membranas na superfície de IrO_x. Realizou-se o crescimento eletroquímico de um filme não condutor de polifenol e também a deposição física de uma membrana de Nafion. Contudo, não permitiram a obtenção dos resultados desejados.

O presente estudo também teve como objectivo a quantificação de azoto assimilável em amostras de vinho, e para tal foram desenvolvidos métodos distintos para a determinação individual de iões amónio e aminoácidos primários.

A primeira aproximação recorreu à construção de um eléctrodo seletivo de iões amónio, de estado sólido, através da deposição de uma membrana seletiva de iões de amónio numa superfície condutora. Diferentes metodologias foram ensaiadas na modificação da superfície com a membrana: imersão numa solução contendo a membrana líquida ou deposição direta ("*casting*"). Apesar de se registar uma variação linear da resposta do sensor com o logaritmo da concentração de ião amónio presente em solução, os resultados revelaram um grande dependência, não só, do método selecionado para depositar a membrana, como uma baixa reprodutibilidade dentro do mesmo método e uma dependência do grau de hidratação da membrana. A introdução de um condutor misto na interface entre o metal e a membrana polimérica revelou que com a introdução de um filme de polipirrolo e uma membrana hidratada durante 24 horas é possível a obtenção de eléctrodos com uma resposta mais rápida e com menor desvio temporal ("*drift*").

A otimização das condições de preparação do eletrodo seletivo de íões amónio (formação, hidratação e a inclusão ou não de condutores mistos entre eletrodo e membrana) não foram efetuados uma vez que testes preliminares revelaram a impossibilidade de efetuar tais medidas em vinho. Durante a produção industrial do vinho, as correções efetuadas à sua composição recorrem a sais de potássio, sendo este um grande interferente na medição de íões amónio. Isto porque o coeficiente de seletividade para o potássio se situa bastante próximo do da íões amónio.

Com o intuito de obter um método fiável de quantificação de azoto assimilável o trabalho prosseguiu através da quantificação de íões amónio e aminoácidos primários por métodos óticos, recorrendo à plataforma Enosense® desenvolvida pela empresa.

Dois métodos distintos para a determinação de íões amónio e aminoácidos, foram desenvolvidos recorrendo à reação entre o-ftaldeído com nucleófilos e respetiva propriedades de fluorescência dos produtos formados. Em ambos os métodos o produto da reação é excitado a uma comprimento de onda situado nos 365 nm sendo a fluorescência medida a 450 nm para o caso dos aminoácidos primários e 421 nm para a deteção de íões amónio.

Por forma a validar as novas metodologias, os resultados obtidos foram comparados com os alcançados pelos métodos rotineiros atualmente empregues na indústria: medida de absorvância do isoindolo formado, recorrendo ao kit comercial K-PANOPA para a determinação dos aminoácidos e determinação por método enzimático usando o kit K-AMIAR para a determinação dos íões amónio.

Os estudos iniciais realizados na determinação dos aminoácidos primários revelaram uma discrepância acentuada entre os valores obtidos para diferentes vinhos pelo método de referência e o novo método baseado em medidas de fluorescência. Após uma análise cuidada dos resultados e com base em diferentes procedimentos testados, constatou-se que essa diferença era apenas devida a uma seleção errónea do aminoácido padrão. Por recurso a um ajuste matemático obteve-se uma excelente correlação entre os dois métodos. As assinaláveis taxas de recuperação obtidas a rondar os 95% demonstram não existir interferência da matriz das amostras de vinho.

O ensaio otimizado quantifica aminoácidos assimiláveis em 12 minutos e com 1 µL de amostra entre 25 e 190 mg/L, sendo possível alterar o volume de amostra e alargar a gama de linearidade por forma a coincidir com a gama de interesse para a área vitivinícola, compreendida entre 30-300 mg/L.

Para a nova metodologia desenvolvida para a deteção de íões amónio por fluorescência, e em oposto ao observado para os aminoácidos, verificou-se uma elevada interferência da matriz nas condições iniciais selecionadas.

Efectuou-se um estudo sistemático, de forma a elucidar se a interferência advém de sulfitos ou aminoácidos, utilizando-se diferentes concentrações destes compostos e os resultados provam que estes compostos não interferem na gama de concentrações usualmente encontrados nestas matrizes.

O efeito da matriz foi minimizado deslocando a gama de linearidade para valores mais baixos de íões amónio permitindo diluir a amostra 151 vezes, deste modo obteve-se um ensaio com duração de 10 minutos, gama de quantificação entre 8 e 48 ng de íões amónio com somente 1 µL de amostra. A adição de 16, 24 e 32 ng de íões amónio à solução de vinho possibilitou obter recuperações de 96, 88 e 103%

respetivamente. A linearidade do método foi demonstrada pela curva de calibração obtida com $R^2=0.997$.

A formação do isoíndole na reação de NH_4^+ -OPA- SO_3^{2-} demonstrou ser quantificável para a determinação de iões amónio em vinhos. A aplicabilidade desta técnica desenvolvida para a quantificação de iões amónio sem alteração do equipamento Enosense® e sem material biológico, reação química, em detrimento do ensaio enzimático comum é de extrema relevância para a empresa que se procura situar no mercado da quantificação de parâmetros inerentes à indústria vinícola.

4.6. Referências bibliográficas

- 1 Marina Bely, Jean-Marie Sablayrolles, and Pierre Barre. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70, 4 (1990), 246-252.
- 2 W. M. Ingledew and Ralph E. Kunkee. Factors Influencing Sluggish Fermentations of Grape Juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (1985), 65-76.
- 3 Francisco F. Monteiro, Eugene K. Trousdale, and Linda F. Bisson. Ethyl Carbamate Formation in Wine: Use of Radioactively Labeled Precursors to Demonstrate the Involvement of Urea. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 1 (1989), 1-8.
- 4 Richard L Davies, D Robin Baigent, Malcolm S Levitt, Yasin Mollah, Carl J Rayner, and Alison B Frensham. Accuracy and precision in amino acid analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, 4 (1992), 423–436.
- 5 Erin M. Sanders and Cornelius S. Ough. Determination of Free Amino Acids in Wine by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (1985), 43-46.
- 6 J, Aerny. Composés azotés des moûts et des vins. *Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture*, 28, 3 (1996), 161-165.
- 7 Ramakrishnan S., Prasannan K.G. , and Rajan R. *Textbook of Medical Biochemistry*. 3^a ed Chennai: Orient Longman Private Limited, 2001.
- 8 Barry H. Gump, Bruce W. Zoecklein, Kenneth C. Fugelsang, and Robert S. Whiton. Comparison of Analytical Methods for Prediction of Prefermentation Nutritional Status of Grape Juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 4 (2002), 325-329.
- 9 L. Filipe-Ribeiro and A. Mendes-Faia. Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chemistry*, 100 (2007), 1272–1277.
- 10 M.Dubernet, V.Dubernet, S.Coulomb, M.Lerch, and Isabelle Traineau. Analyse objective de la qualité des vendanges par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et réseaux de neurones. *Revue Française d'Œnologie*, 185 (2000), 18-21.
- 11 Matthieu Dubernet, Marc Dubernet, Françoise Grasset, and A.Garcia. Analyse de l'azote assimilable dans les moûts par Interférométrie Infrarouge à Transformée de Fourier. *Revue Française d'Œnologie*, 187 (2001), 9-13.
- 12 Bruce C. Dukes and Christian E. Butzke. Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49

- (1998), 125-134.
- 13 D. J. McWilliam and C. S. Ough. Measurement of Ammonia in Musts and Wines Using a Selective Electrode. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25 (1974), 67-72.
 - 14 Barry H.Gump, Bruce W.Zoecklein, and Kenneth C.Fugelsang. Prediction of prefermentation nutritional status of grape juice - The formol method. *Food Microbiology Protocols*, 14 (2001), 283-304.
 - 15 Akkaş M., Akyildiz I, and Sokullu R. Terahertz Channel Modeling of Underground Sensor Networks in Oil Reservoirs. *Ad Hoc and Sensor Networking Symposium* (2012), 543-548.
 - 16 B., Smith. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. CRC Press LLC, 1999.
 - 17 Patz C.D., Blieke A., Ristow R., and Dietrich H. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 513, 1 (2004), 81-89.
 - 18 Ferreira M.L. and Barros P. Validation of new calibrations for FTIR wine analysis. In *33º Congrès International de la Vigne et du Vin* (Georgia 2010).
 - 19 R.M. Callejón, A.M. Troncoso, and M.L. Morales. Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta* , 81 (2010), 1143–1152.
 - 20 H.U. Bergmeyer and H.O. Beutler. Ammonia. *Methods of Enzymatic Analysis*, 8 (1985), 454–461.
 - 21 R. P. Buck, S. Rondinini, A. K. Covington et al. Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002). *Pure and Applied Chemistry*, 74, 11 (2002), 2169–2200.
 - 22 Friedrich G. K. Baucke. New IUPAC recommendations on the measurement of pH – background and essentials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374 (2002), 772–777.
 - 23 N.-H. Kwon, K.-S. Lee, M.-S. Won, and Y.-B. Shim. An all-solid-state reference electrode based on the layer-by-layer polymer coating. *The Analyst*, 132, 9 (2007), 906–912.
 - 24 Karyakin, AA, Vuki, M, Lukachova, LV, Karyakina, EE, Orlov, AV, Karpachova, GP, and Wang, J. Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer application to biosensor. *Journal of Analytical Chemistry*, 71 (1999), 2534–2540.
 - 25 Brian J. Polk, Anna Stelzenmuller, Geraldine Mijares, William MacCrehan, and Michael Gaitan. Ag/AgCl microelectrodes with improved stability for microfluidics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114, 1 (2006), 239–247.
 - 26 M. Waleed Shinwari, David Zhitomirsky, Imran A. Deen, P. R. Selvaganapathy, M. Jamal Deen, and D. Landheer. Microfabricated Reference Electrodes and their Biosensing Applications. *Sensors*, 10, 3 (2010), 1679-1715.

- 27 Cranny A.W.J. and Atkinson J.K. Thick film silver-silver chloride reference electrodes. *Measurement Science and Technology*, 9 (1998), 1557–1565.
- 28 Suzuki H., Shiroishi H., Sasaki S., and Karube I. Microfabricated liquid junction Ag/AgCl reference electrode and its application to a one-chip potentiometric sensor. *Analytical Chemistry*, 71 (1999), 5069–5075.
- 29 Suzuki H., Hiratsuka A., Sasaki S., and Karube L. Problems associated with the thin-film Ag/AgCl reference electrode and a novel structure with improved durability. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 46 (1998), 104–113.
- 30 Kim H.R., Kim Y.D., Kim K.I., Shim J.H., Nam H., and Kang B.K. Enhancement of physical and chemical properties of thin film Ag/AgCl reference electrode using a Ni buffer layer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 97 (2004), 348–354.
- 31 Elsen H.A., Monson C.F., and Majda M. Effects of electrodeposition conditions and protocol on the properties of iridium oxide pH sensor electrodes. *Journal of The Electrochemical Society*, 156 (2009), F1–F6.
- 32 Kadara R.O., Jenkinson N., and Banks C.E. Characterization and fabrication of disposable screen printed microelectrodes. *Electrochemistry Communications*, 11 (2009), 1377–1380.
- 33 Kinlen P.J., Heider J.E., and Hubbard D.E. A solid-state pH sensor based on a Nafion-coated iridium oxide indicator electrode and a polymer-based silver chloride reference electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 22 (1994), 13–25.
- 34 Kreider K.G., Tarlov M.J., and Cline J.P. Sputtered thin-film pH electrodes of platinum, palladium, ruthenium, and iridium oxides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 28 (1995), 167–172.
- 35 Cogan S.F., Ehrlich J., Plante T.D., Smirnov A., Shire D.B., Gingerich M., and Rizzo J.F. Sputtered iridium oxide films for neural stimulation electrodes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 89 (2008), 353–361.
- 36 Katsube T., Lauks L., and Zemel J.N. pH-sensitive sputtered iridium oxide films. *Sensors Actuators*, 2 (1982), 399–410.
- 37 Mark E. Meyerhoff. Polymer Membrane Electrode Based Potentiometric Ammonia Gas Sensor. *Analytical Chemistry*, 52, 9 (1980), 1532–1534.
- 38 Yamanaka K. Anodically Electrodeposited Iridium Oxide-Films (Aeirof) from Alkaline-Solutions for Electrochromic Display Devices. *Japanese Journal of Applied Physics*, 28 (1989), 632–637.
- 39 Peter G. Pickup and V.I. Birss. A model for anodic hydrous oxide growth at iridium. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 220, 1 (1987), 83-100.
- 40 M.A Petit and V. Plichon. Anodic Electrodeposition of Iridium Oxide Films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 444 (1998), 247-252.

- 41 Min Wang and Sheng Yao. Carbonate-Melt Oxidized Iridium Wire for pH Sensing. *Electroanalysis*, 15, 20 (2003), 1606-1615.
- 42 Liu CC, Bocchicchio DB, Overmyer PA, and Neuman MR. A Palladium-palladium oxide miniature pH electrode. *Science*, 207 (1980), 188-189.
- 43 Matthew J. O'Malley. *Li⁺/H⁺ ion-exchanged Li₂MO₃ (M = Ir, Pt) and carbonate melt oxidized IrOx pH sensors*. 2008.
- 44 Kosuke Izutsu and Hiroki Yamamot. Response of an Iridium Oxide pH-Sensor in Nonaqueous Solutions. Comparison with Other pH-Sensors. *Analytical Sciences*, 12, 6 (1996), 905-909.
- 45 Y. Kamegaya, K. Sasaki, M. Oguri, T. Asaki, H. Kobayashi, and T. Mitamura. Improved durability of iridium oxide coated titanium anode with interlayers for oxygen evolution at high current densities. *Electrochimica Acta*, 40, 1 (1995), 889-895.
- 46 Heine A. Hansen, Isabela C. Man, Felix Studt, Frank Abild-Pedersen, Thomas Bligaard, and Jan Rossmeisl. Electrochemical chlorine evolution at rutile oxide (110) surfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, 1 (2010), 283–290.
- 47 Joo-Yul Lee, Dae-Keun Kang, KyuHwan Lee, and DoYon Chang. An Investigation on the Electrochemical Characteristics of Ta₂O₅-IrO_x Anodes for the Application of Electrolysis Process. *Materials Sciences and Applications*, 2, 4 (2011), 237-243.
- 48 Jonas Backholm and Gunnar A. Niklasson. Optical properties of electrochromic iridium oxide and iridium–tantalum oxide thin films in different colouration states. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 91, 11 (2008), 1388–1392.
- 49 Saeid Kakooei, Mokhtar Che Ismail, and Bambang Ari-Wahjoedi. An overview of pH Sensors Based on Iridium Oxide: Fabrication and Application. *International Journal of Material Science Innovations*, 1, 1 (2013), 62-72.
- 50 Achintya N. Bezbaruah and Tian C. Zhang. Fabrication of Anodically Electrodeposited Iridium Oxide Film pH Microelectrodes for Microenvironmental Studies. *Analytical Chemistry*, 74, 22 (2002), 5726-5733.
- 51 Jin Hu, Mamdouh Abdelsalam, Philip Bartlett et al. Electrodeposition of highly ordered macroporous iridium oxide through self-assembled colloidal templates. *Journal of Materials Chemistry*, 19 (2009), 3855-3858.
- 52 V.I. Birss, C. Bock, and H. Elzanowska. Hydrous ir oxide films: the mechanism of the anodic prepeak reaction. *Canadian Journal of Chemistry*, 75, 11 (1997), 1687-1693.
- 53 S. Asavapiriyant, G.K. Chandler, G.A. Gunawardena, and D. Pletcher. The electrodeposition of polypyrrole films from aqueous solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 77, 1-2 (1984),

- 229-244.
- 54 Ross D. Meyer, Stuart F. Cogan, Trung H. Nguyen, and R. David Rauh. Electrodeposited Iridium Oxide for Neural Stimulation and Recording Electrodes. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 9, 1 (2001), 2-11.
 - 55 Hadi Abroshan, Hamed Akbarzadeh, Farid Taherkhani, and Gholamabbas Parsafar. Effect of a monomeric sequence on the structure of hydrated Nafion in the sandwich model and solvent dynamics in nano-channels: a molecular dynamic study. *Molecular Physics*, 108, 24 (2010), 3393–3404.
 - 56 John W. Severinghaus and A. Freeman Bradley. Electrodes for Blood pO₂ and pCO₂ Determination. *Journal of Applied Physiology*, 13, 3 (1958), 515-520.
 - 57 Johan Bobacka, Ari Ivaska, and Andrzej Lewenstam. Potentiometric Ion Sensors. *Chemical Reviews*, 108, 2 (2008), 329-351.
 - 58 Agata Michalska, Marcin Wojciechowski, Ewa Bulska, and Krzysztof Maksymiuk. Experimental study on stability of different solid contact arrangements of ion-selective electrodes. *Talanta*, 82 (2010), 151–157.
 - 59 Johan Bobacka. Potential Stability of All-Solid-State Ion-Selective Electrodes Using Conducting Polymers as Ion-to-Electron Transducers. *Analytical Chemistry*, 71, 21 (1999), 4932–4937.
 - 60 Do Phuc Quan, Chu Xuan Quang, Le The Duan, and Pham Hung Viet. A Conductive Polypyrrole Based Ammonium Ion Selective Electrode. *Environmental Monitoring and Assessment*, 70 (2001), 153–165.
 - 61 M.J.Medina Hernández, R.M.Villanueva Camañas, and M.C.García Alvarez-Coque. Determination of total free amino acids with o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. *Microchemical Journal*, 42, 3 (1990), 288-293.
 - 62 Marc Roth. Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry*, 43, 7 (1971), 880-882.
 - 63 Svedas VJ, Galaev IJ, Borisov IL, and Berezin IV. The interaction of amino acids with ophthaldialdehyde: a kinetic study and spectrophotometric assay of the reaction product. *Analytical Biochemistry*, 101, 1 (1980), 188-95.
 - 64 Kazuhiro Imai, Toshimasa Toyo'oka, and Hiroshi Miyano. Fluorogenic Reagents for Primary and Secondary Amines and Thiols in High-performance Liquid Chromatography. *Analyst*, 109 (1984), 1365 – 1373.
 - 65 M. C. García Alvarez-Coque, M. J. Medina Hernández, R. M. Villanueva Camañas, and C. Mongay Fernández. Spectrophotometric determination of N-acetylcysteine in drug formulations with o-phthalaldehyde and isoleucine. *Analyst*, 114 (1989), 975-977.
 - 66 H. Frister, H. Meisel, and E. Schlimme. OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium chloride as thiol component. *Originalarbeiten Biological Material*, 330, 7 (1988), 631-633.

- 67 M.J.Medina Hernández, R.M.Villanueva Camañas, and M.C.Garcia Alvarez-Coque. Spectrophotometric determination of cystine by formation of an o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine derivative. *Microchemical Journal*, 40, 3 (1989), 292-296.
- 68 R. Hanczko and I. Molnár-Perl. Derivatization, Stability and Chromatographic Behavior of o-Phthalaldehyde Amino Acid and Amine Derivatives: o-Phthalaldehyde/ 2-Mercaptoethanol Reagent. *Chromatographia* , 57, S (2003), 103-113.
- 69 Alain Aminot and Roger Kérouel. The determination of total dissolved free primary amines in seawater: Critical factors, optimized procedure and artefact correction. *Marine Chemistry* , 98, 2-4 (2006), 223-240.
- 70 P. Fürst, L. Pollack, T.A. Graser, H. Godel, and P. Stehle. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *Journal of Chromatography A*, 499 (1990), 557-569.
- 71 Ying Liang, Yingming Pan, Qing Guo, Hongzhi Hu, Chancui Wu, and Qian Zhang. A Novel Analytical Method for Trace Ammonium in Freshwater and Seawater Using 4-Methoxyphthalaldehyde as Fluorescent Reagent. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015 (2015), 1-7.
- 72 Mana H and Spohn U. Sensitive and selective flow injection analysis of hydrogen sulfite/sulfur dioxide by fluorescence detection with and without membrane separation by gas diffusion. *Analytical Chemistry*, 73, 13 (2001), 3187-3192.
- 73 Z. Huang and C. S. Ough. Amino Acid Profiles of Commercial Grape Juices and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42 (1991), 261-267.
- 74 J. G. B. Castor and T. E. Archer. Amino Acids in Must and Wines, Proline, Serine and Threonine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 7 (1956), 19-25.
- 75 Patrick Poulin and Émilien Pelletier. Determination of ammonium using a microplate-based fluorometric technique. *Talanta*, 71, 4 (2007), 1500–1506.
- 76 Watson RJ, Butler EC, Clementson LA, and Berry KM. Flow-injection analysis with fluorescence detection for the determination of trace levels of ammonium in seawater. *Journal of Environmental Monitoring*, 7, 1 (2005), 37-42.
- 77 Monzir S. Abdel-Latif. New Spectrophotometric Method for Sulfite Determination. *Analytical Letters*, 27, 13 (1994), 2601-2614.
- 78 Ibolya Molnár-Perl and Imre Bozor. Comparison of the stability and UV and fluorescence characteristics of the o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents and those of their amino acid derivatives. *Journal of Chromatography A*, 798, 1-2, 37–46.

- 79 Shuhua Xue, Katsumi Uchiyama, and Hai-fang Li. Determination of ammonium on an integrated microchip with LED-induced fluorescence detection. *Journal of Environmental Sciences*, 24, 3 (2012), 564–570.
- 80 Li Qian Yin, Dong Xing Yuan, and Min Zhang. Determination of sulfite in water samples by flow injection analysis with fluorescence detection. *Chinese Chemical Letters*, 21, 12 (2010), 1457–1461.

Capítulo 5

Conclusões finais e perspectivas
futuras

5.1. Conclusões finais e perspectivas futuras

Os resultados apresentados na presente tese de doutoramento foram obtidos em função da participação em projetos de I&D em que a empresa de acolhimento participou. De salientar que foram não só projetos externos com outras entidades mas também projetos internos de investigação e desenvolvimento da própria empresa.

O produto que a empresa, Lumisense Lda, pretende colocar no mercado consiste num analisador automático portátil para a indústria agroalimentar, e deste modo o trabalho desenvolvido ao longo desta tese centrou-se num objetivo central: estudo e desenvolvimento de tecnologia e metodologias para a determinação analítica de compostos de interesse industrial para a indústria agroalimentar. Os objetivos científicos foram definidos em linha com a participação da Empresa em projetos de I&D europeus e nacionais.

Pelo fato de o mercado de entrada da empresa ser a indústria vitivinícola, especial ênfase foi consagrado na deteção de compostos e na aplicação das tecnologias em amostras de vinho.

De um ponto de vista dos métodos selecionados para a deteção destes compostos, com a exceção da determinação do pH (potenciometria) todos os outros se baseiam em medidas de intensidade ótica, em particular de quimioluminescência com e sem perturbação eletroquímica, absorvância e de fluorescência.

No primeiro capítulo de resultados é apresentado o trabalho desenvolvido para a elaboração de uma plataforma para aplicação em biossensores óticos baseados em eletroquimioluminescência. O objetivo final para a construção desta plataforma consiste na síntese e respetiva imobilização, à superfície de um elétrodo, de polieletrólitos contendo grupos ferroceno, grupos luminol, e biomoléculas na sua estrutura. O trabalho realizado foca-se na investigação necessária para a obtenção de superfícies de elérodos com o mediador redox imobilizado. Para atingir tal objetivo foi necessário a síntese química de um polieletrólito contendo grupos ferrocenos na sua estrutura, sua caracterização, deposição e caracterização dos elérodos modificados (ITO e ouro) em termos de repostas eletroquímicas e óticas.

Foram testadas duas superfícies de elérodos para a deposição destes polieletrólitos funcionalizados, ouro e ITO, demonstrando-se que apenas na superfície de ITO se observa o processo de mediação dos metalocenos na reação de quimioluminescência para o sistema luminol/ H_2O_2 . Esta intermediação traduziu-se num desvio negativo considerável de 400 mV, do processo EQL na presença dum mediador redox.

A eficácia da síntese química de polieletrólitos catiónicos contendo grupos ferroceno na sua estrutura foi confirmada através da resposta eletroquímica do par redox, evidenciada para os elérodos modificados com este material. Através do comportamento eletroquímico foi inferida a carga correspondente à oxidação/redução do material eletroativo depositado e o mecanismo de transferência de carga envolvido, confirmando a sua imobilização à superfície. Em ambos os materiais de elérodos se verificou uma elevada estabilidade da resposta dos grupos ferroceno imobilizados, em meio ácido. Uma perda de eletroatividade dos mesmos foi detetada, no entanto, quando os elérodos modificados foram perturbados electroquimicamente em soluções neutras ou básicas, pH necessários para uma ideal reação entre o luminol e o peróxido de hidrogénio.

De que se tenha conhecimento este é um trabalho original, não se tendo detetado qualquer trabalho na literatura que recorra a polieletrólitos contendo grupos ferroceno para catalisar a reação de quimioluminescência entre o luminol e o peróxido de hidrogénio. Os resultados aqui descritos e discutidos abrem portas a mais estudos de otimização para que este tipo de elétrodos modificados que contém um medidor imobilizado possam ser eficazmente utilizados em sistemas analíticos.

Os estudos futuros envolvendo este sistema deverão centrar-se em avaliar o comportamento dos elétrodos modificados com Fc-PAH por microbalança de cristal de quartzo para acompanhar os processos de variação de massa. Em particular durante os processos eletroquímicos realizados em meios neutros e básicos. Deverão igualmente encetar-se esforços na avaliação do comportamento de diferentes polieletrólitos contendo grupos ferroceno (e.g. polietilenimina) e na síntese de um polieletrólito aniónico modificado com luminol.

Seguindo a estrutura apresentada na tese, o trabalho seguinte reportou o desenvolvimento de um equipamento e associado método analítico para a deteção de ocratoxina A em amostras de cereais e vinho.

Os resultados apresentados refletem a elevada componente tecnológica deste capítulo, consequência da necessidade de obtenção de um equipamento funcional com requisitos bem definidos. Na posse do equipamento na sua versão final, foi possível a obtenção de resultados de carácter mais científico respeitantes à otimização de todos os parâmetros para o funcionamento de um imunoensaio com transdução ótica.

A obtenção do equipamento na sua versão final foi um processo iterativo e progressivo, tendo sido contruídos quatro versões distintas. De uma forma sucinta realizou-se a conceção, desenho, construção e teste de bomba peristáltica miniatura; elaborou-se os requisitos para redesenhar a placa eletrónica de controlo do equipamento; realizou-se o desenvolvimento do *software* de controlo embebido (*firmware*).

Um novo imunoensaio competitivo direto miniaturizado, para deteção de Ocratoxina A, foi desenvolvido com sucesso. Para tal foram desenvolvidas e testadas diferentes estruturas microfluídicas. Um estudo sistemático envolvendo a otimização das concentrações dos diferentes reagentes e parâmetros experimentais foi realizado.

A deteção otimizada de OTA recorrendo às estruturas microfluídicas desenvolvidas ocorre quando a imobilização prévia de OTA-BSA é realizada através da passagem de uma solução contendo 50 µg/ml a 10 µl/min e durante um minuto. Por sua vez o processo de deteção de OTA apresenta uma sensibilidade máxima numa gama linear mais alargada de concentrações, quando se recorre a uma deteção com uma solução de anti-OTA-HRP com concentração de 2 µ/ml, durante três minutos, a um fluxo de 5 µl/min.

A conjugação do novo equipamento e respetivas estruturas microfluídicas revelaram-se eficientes para a deteção de OTA em vinho no limite legal de 2 ng/mL, tendo sido o protótipo validado também para a deteção de OTA em cereais de alimentação animal para 50 ppb, cinco vezes inferior ao limite legal estabelecido pela união europeia, podendo facilmente o ensaio ser ajustado para a deteção no limite legal de 250 ppb

O sucesso no desenvolvimento do protótipo pré-industrial antevê a sua conversão num produto final para comercialização num futuro próximo. Para tal serão ainda

necessários efetuar os processos de validação para diferentes matrizes, como vinho e cerveja. Seria bastante vantajoso conseguir implementar alterações de modo a minimizar o tempo despendido pelo operador, isto é, minimizar o número de interações que o operador tem com a máquina em cada ensaio. Este fato pode ser resolvido automatizando um chip previamente cheio pelo operador no início (somente uma interação com o aparelho) e que após introdução no equipamento este dê continuidade ao processo do início ao fim.

Com o intuito puramente comercial seria interessante despendar algum esforço na procura de novos materiais para o fabrico do chip, de modo a reduzir o seu preço de produção. A transformação do equipamento de análise única em multi-paramétrico, para diferentes tipos de micotoxinas, é a sequência lógica deste trabalho. A capacidade da adição de novos ensaios, além de ocratoxina A, dependerá da disponibilidade de anticorpos monoclonais sensíveis e específicos, da preparação dos conjugados específicos e a prevenção da interferência entre os ensaios (*“cross-talk”*).

No último capítulo da tese expuseram-se os resultados obtidos no desenvolvimento de sensores e metodologias para a quantificação de pH, iões amónio e aminoácidos primários em amostras de vinho.

Para a construção de um eléctrodo de pH de estado sólido, facilmente miniaturizável, optou-se por determinar as condições experimentais indicadas, para o crescimento de óxidos mistos de irídio em superfícies de ouro recorrendo a métodos eletroquímicos (potenciodinâmicos e galvanostáticos). O crescimento dos filmes foi otimizado de modo a obter uma elevada estabilidade dos filmes depositados e tempos curtos de resposta, tendo-se revelado um melhor desempenho para os filmes depositados por métodos galvanostáticos. Foi obtida uma resposta supra-nernstiana (70 mV/pH) com excelente linearidade para um intervalo de pH compreendido entre 2 e 7.

A determinação do pH de amostras de vinho, recorrendo aos sensores de pH desenvolvidos, não foi possível, em virtude de interferência de compostos redox na matriz de vinho. Esforços para minimizar estas interferências por meio de membranas adicionais mostraram-se infrutíferos, ao contrário da determinação de iões amónio e aminoácidos primários, que com base nos novos métodos desenvolvidos neste trabalho, permitiu a quantificação de azoto assimilável em amostras de vinho.

A determinação de iões amónio foi concretizada por dois métodos analíticos distintos. Recorrendo a um eléctrodo seletivo de amónio, desenvolvido ao longo do trabalho, e por medidas de fluorescência de isoíndoles formados através de uma reação e condições experimentais específicas.

A construção de um ISE de estado sólido que responda de forma linear a diferentes concentrações de iões amónio em solução foi conseguida. Após a otimização das condições experimentais, o eléctrodo revelou uma variação linear da resposta do sensor com o logaritmo da concentração de ião amónio presente em soluções padrão, mas extremamente dependente do método de deposição da camada polimérica, do nível de hidratação da mesma, revelando ainda uma fraca reprodutibilidade no processo de produção. A introdução de um condutor misto na interface entre o metal e a membrana polimérica melhora a resposta dos eléctrodos, nomeadamente com a introdução de um filme de polipirrol e uma membrana hidratada durante 24 horas obtendo-se eléctrodos com uma resposta mais rápida e como menor desvio temporal.. Contudo, a quantificação de iões amónio em amostras reais (vinho), recorrendo ao ISE

desenvolvido não foi possível, devido à elevada concentrações de iões potássio nas mesmas.

A determinação de, não só iões amónio em amostras de vinho, mas também de aminoácidos primários, foi conseguida por recurso a novas metodologias desenvolvidas e recorrendo à plataforma Enosense® da empresa.

Fazendo uso da reação específica entre *orto*-ftaldeído com diferentes nucleófilos (tióis e iões sulfito) e medindo a intensidade de sinal ótico proveniente das propriedades de fluorescência dos produtos formados, foi possível quantificar os compostos que constituem o azoto assimilável das leveduras. O sinal ótico adquirido, aquando da excitação dos produtos formados com uma fonte de 365 nm, permite quantificar aminoácidos primários e iões amónio recolhendo o sinal emitido, a 450 e 421 nm respetivamente.

Uma análise cuidada dos resultados obtidos na determinação de aminoácidos por fluorescência, permitiu concluir que o padrão de isoleucina, usualmente empregue na quantificação recorrendo a medidas de absorvância, não é o mais indicado para uma deteção por fluorescência. Uma excelente correlação entre o método de referência selecionado e o procedimento desenvolvido foi atingida através de um simples ajuste matemático contabilizando este aspeto. A vantagem de não existirem efeitos de matriz para a nova metodologia baseada em medidas de fluorescência é manifestada pelas elevadas taxas de recuperações obtidas para este método.

Após otimização, foi possível quantificar aminoácidos primários em 12 minutos e com apenas 1 µL de amostra num intervalo de linearidade entre 25 e 190 mg/L, sendo que é possível ajustar a gama de linearidade adaptando o volume de amostra.

Em oposto ao observado para a deteção de aminoácidos recorrendo a medidas de fluorescência dos isoíndoles formados, na determinação de iões amónio em vinho, foi observada uma elevada influência da matriz. Os ensaios realizados para determinar a influência da presença de iões sulfitos e aminoácidos, na composição inicial da amostra, permitem despistar estes compostos como os responsáveis por tal interferência.

A influência da matriz, foi no entanto anulada, realizando uma maior diluição da amostra de vinho, conseguindo-se atingir uma gama de quantificação de 8 a 48 ng de iões amónio com somente 1 µL de amostra. Obtiveram-se taxas de recuperação excelentes para a determinação de iões amónio com uma linearidade ótima observada entre o sinal de fluorescência e a concentração de iões amónio presente em solução.

A possibilidade de quantificar iões amónio em amostras de vinho, por um método fiável e rápido e sem recurso a elementos biológicos, como os atualmente empregues, é um resultado de interesse extremo para a empresa.

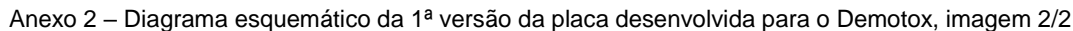
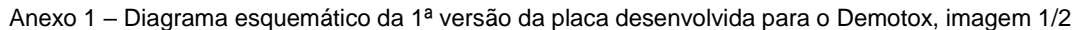
De modo a comercializar as técnicas desenvolvidas é fundamental proceder à determinação de iões amónio e aminoácidos assimiláveis para mostos bem como efetuar uma análise estatística de resultados de modo a avaliar a precisão e reprodutibilidade dos métodos.

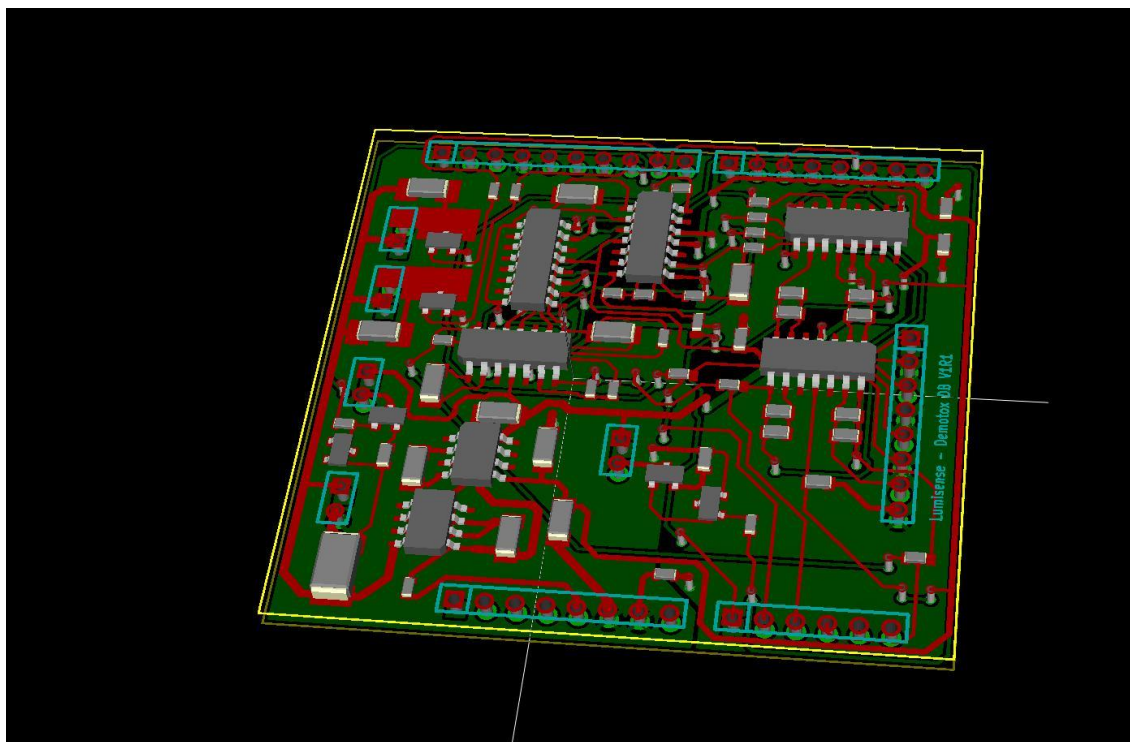
Para constituir uma mais-valia inequívoca é importante verificar a possibilidade de quantificação de azoto assimilável recorrendo à junção dos dois métodos, efetuando a determinação de iões amónio a 421 nm, sabendo de antemão que esta técnica não contabiliza aminoácidos assimiláveis, seguido de forma sequencial da determinação

de aminoácidos assimiláveis a 450 nm com recurso à adição de N-acetil-L-cisteína à solução.

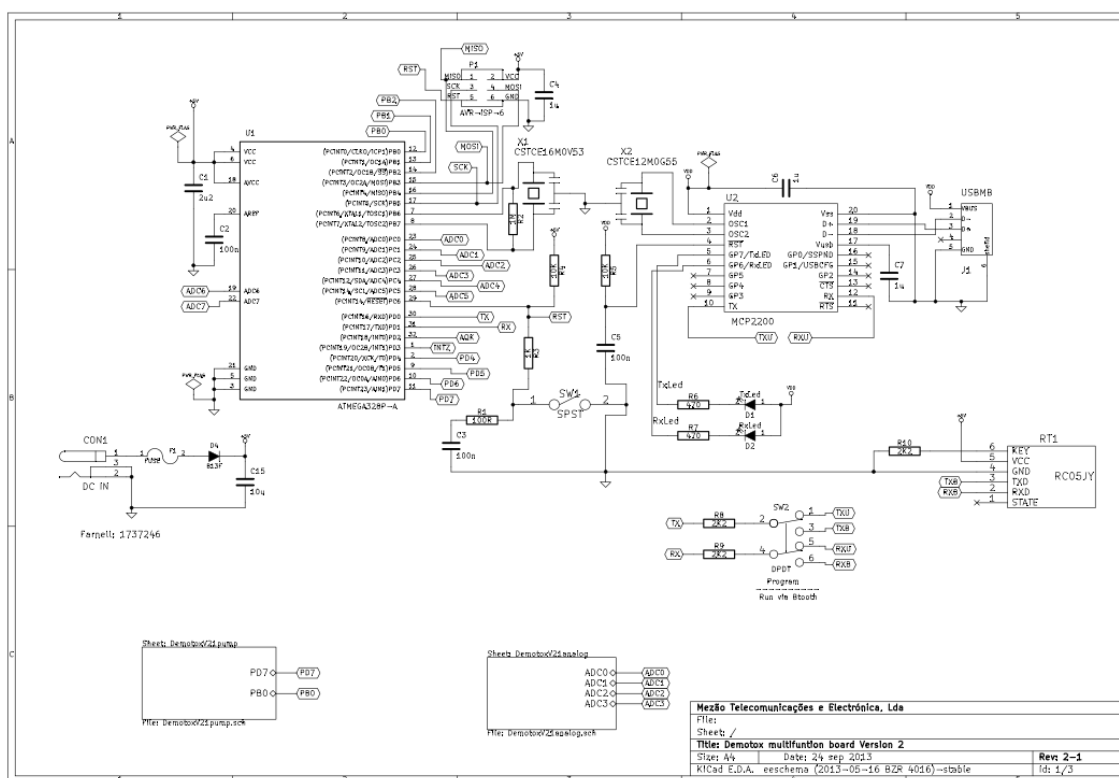
O trabalho executado ao longo da tese de doutoramento em empresa permitiu-me adquirir novas competências em áreas tão distintas como: domínio de métodos eletroquímicos, métodos de aquisição de sinal ótico; desenho técnico em 3D, domínio de técnicas de impressão 3D por filamento (conversão de desenhos 3D em ficheiros .STL, domínio de ferramentas informáticas de preparação do objeto para impressão (*slicer*); domínio de *software* de CAD/CAM para maquinaria CNC, domínio básico de programação em C++ em ambiente Arduino, fabrico de estruturas microfluídicas por litrografia suave ("*soft-lithography*"), experiência na estruturação e execução de imunoensaios miniaturizados e adquirir experiência na participação em projetos nacionais e internacionais.

Anexos

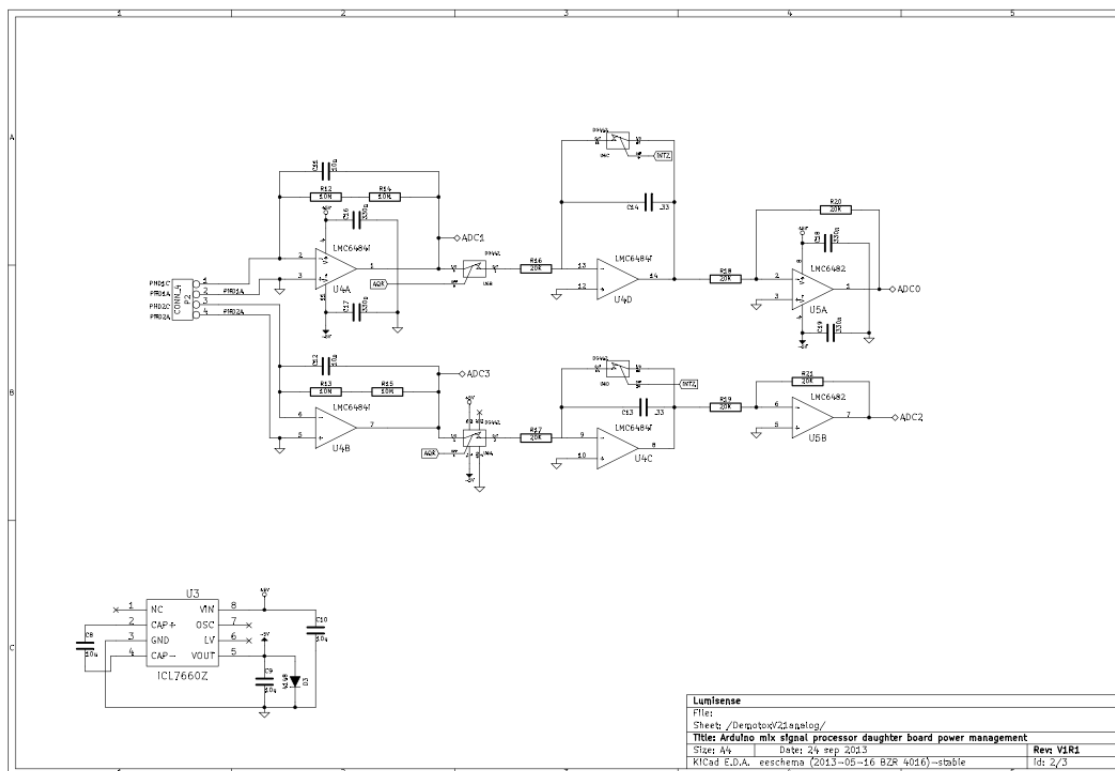




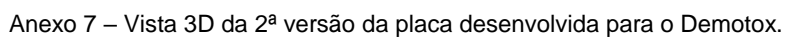
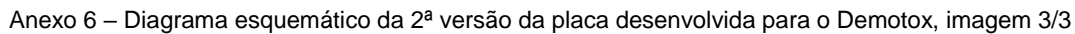
Anexo 3 – Vista 3D da 1ª versão da placa desenvolvida para o Demotox.

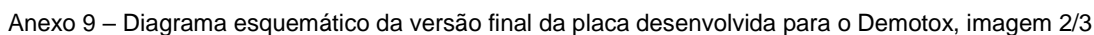
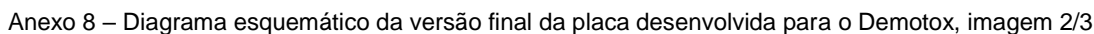


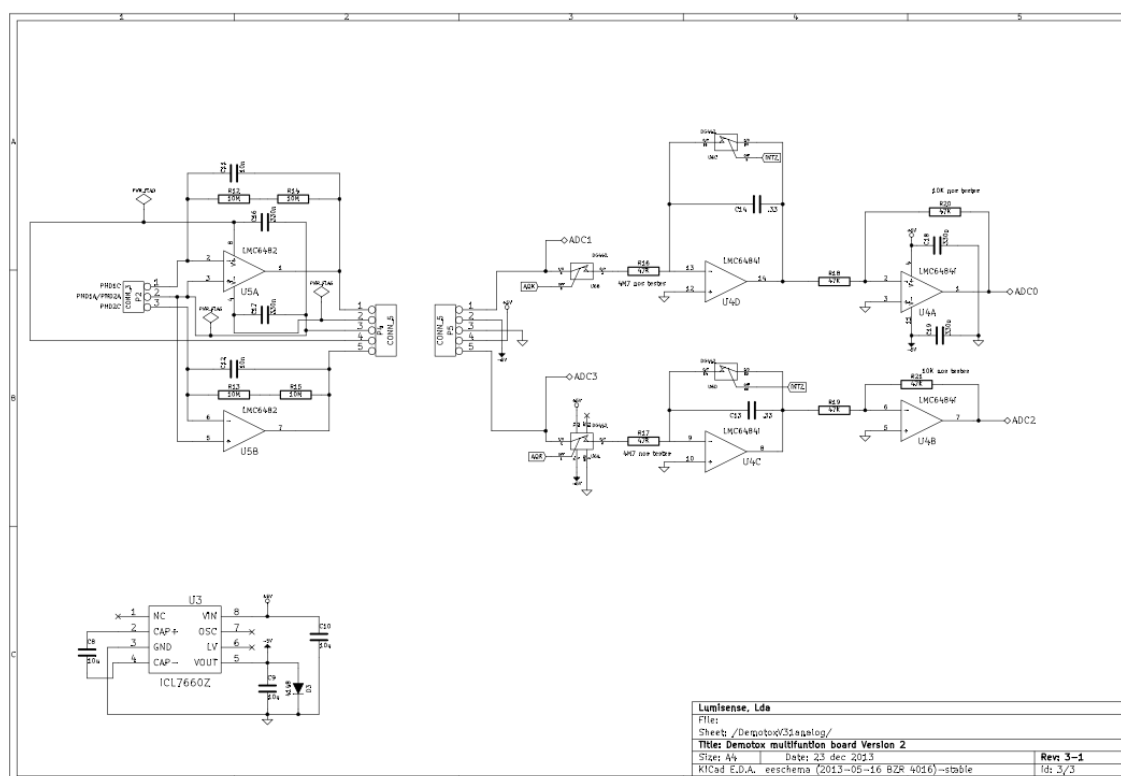
Anexo 4 – Diagrama esquemático da 2ª versão da placa desenvolvida para o Demotox, imagem 1/3



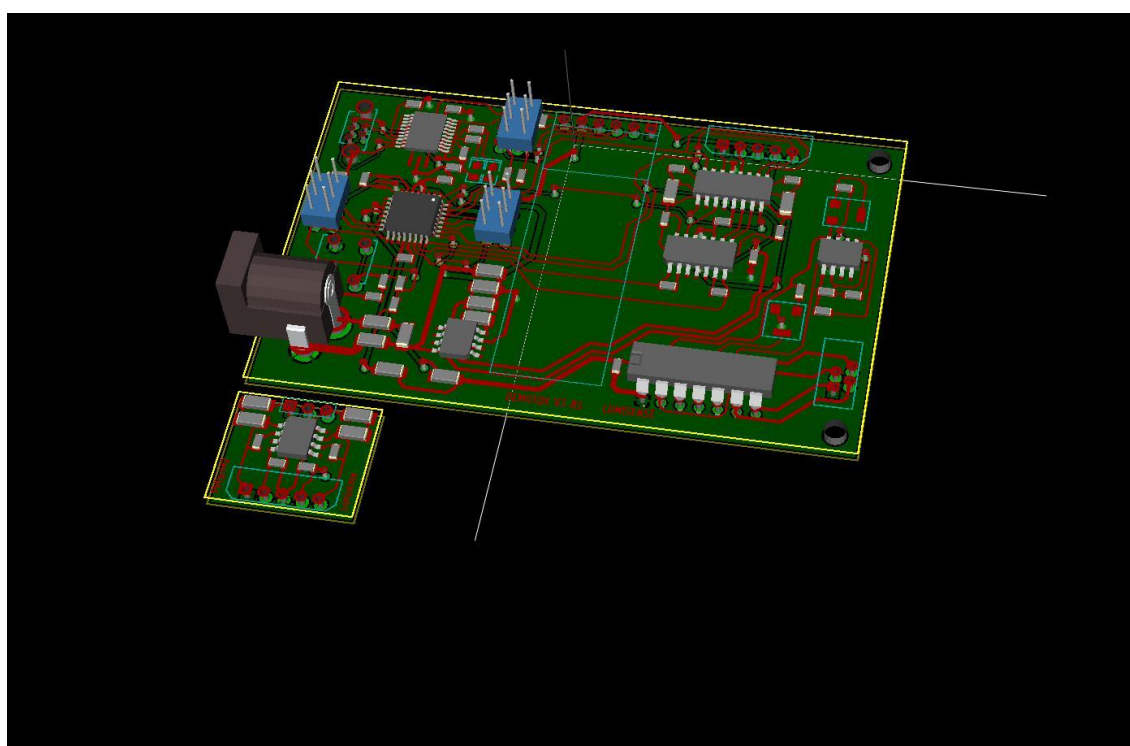
Anexo 5 – Diagrama esquemático da 2ª versão da placa desenvolvida para o Demotox, imagem 2/3







Anexo 10 – Diagrama esquemático da versão final da placa desenvolvida para o Demotox, imagem 3/3



Anexo 11 – Vista 3D da versão final da placa desenvolvida para o Demotox.

